



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

**Isabel Cristina Matias Aeromicologia Hospitalar
Soares**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

Isabel Cristina Matias Soares Aeromicologia Hospitalar

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro e da Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

A ciência é como uma sucessão de porta fechadas que vamos abrindo por etapas conquistadas.”

Albert Einstein

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Helena Abreu Silva
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutora Glória Catarina Cintra da Costa Pinto
investigadora auxiliar do Centro de estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro

co-orientadora

Prof. Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves
professora auxiliar convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

orientador

Prof. Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
investigador auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

No momento em que finalizo este trabalho desejo exprimir a minha gratidão a todos os que o tornaram possível. Dificilmente teria sido viável concretizá-lo sem a solidariedade e o estímulo intelectual que, de diferentes formas, me foi proporcionado por colegas, professores, amigos e familiares.

No entanto, existem pessoas às quais não posso deixar de particularizar esse reconhecimento, pois estiveram “demasiadamente” envolvidas neste percurso:

À minha família por TUDO!

Ao Prof. Dr António Correia, por me ter dado a possibilidade de realizar este estudo no laboratório de Microbiologia Molecular no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro;

Ao Prof. Dr Artur Alves, pelo seu apoio, paciência e disponibilidade;

A toda a equipa do laboratório de Microbiologia pelas palavras de apoio, pela ajuda logística quando recorri e pelo bom ambiente que proporcionam; em especial à Juliana e à Márcia pela sua disponibilidade e prontidão.

Aos meus colegas e amigos em especial à Joana Rita Mendes, pela amizade ajuda e apoio moral;

Aos meus colegas do laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Infante D. Pedro – Aveiro, pelo tempo disponível que me cederam.

A todos: Muito obrigada!

palavras-chave

Qualidade do ar interior, fungos filamentosos, infecções nosocomiais, fungos do ar, hospital.

resumo

A qualidade do ar no interior dos edifícios depende de vários factores físicos, químicos e biológicos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) refere que todos os anos são gastos cerca de 4% do Produto Interno Bruto (PIB) com custos directamente associados a doenças profissionais e acidentes

Os fungos dispersos através da atmosfera são susceptíveis de provocar doenças ao Homem quando entram em contacto com a pele e mucosas, quer por contacto directo quer após a sua inalação.

Em Portugal, os estudos aerobiológicos são escassos designadamente no que concerne ao estudo da concentração atmosférica e da diversidade dos microrganismos existentes no ar de hospitais e outras instalações clínicas.

Com este trabalho pretendeu-se identificar os fungos filamentosos do ar interior de dois hospitais portugueses, tendo presente, designadamente, que o Decreto-Lei nº79/2006, de 4 de Abril, regulamenta os níveis de concentração máxima de microrganismos, devendo, assim, ser um referencial importante na avaliação dos resultados obtidos.

A identificação de espécies pode ser uma tarefa difícil, baseada exclusivamente em caracteres morfológicos e culturais. Nesse aspecto, a aplicação de métodos moleculares, em particular técnicas baseadas em PCR, pode representar uma grande ajuda. A utilização de marcadores moleculares para identificação da espécie de fungos mais comum foi o RFLP com ITS rDNA.

A contaminação de fungos em instalações de saúde tem mostrado várias infecções nosocomiais causadas por várias espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*.

Neste estudo foi identificado um género *Aspergillus* que poderá estar envolvido em infecções nosocomiais, eventualmente relacionado com o sistema de ventilação, filtros de ar, exaustores e movimentação das pessoas em unidades críticas. Por outro lado, pode-se afirmar que o número de cirurgias não influencia a quantidade do número de fungos detectados.

No Hospital A ocorre fungos contaminantes oportunistas de propagação aérea e o género *Rhodotorula* (levedura). O Hospital B apresenta em particular *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. que estão sobretudo envolvidos na génese da asma e alveolites alérgicas bem como o género *Pichia* (levedura).

Nos dois hospitais estudados as espécies com maior representação foram *Cladosporium*, *Penicillium* e *Botrytis*.

keywords

Indoor air quality, filamentous fungi, operating theater, airborne fungi, hospital.

abstract

The quality of the air inside the houses depends on several physical, chemical and biological factors. The World Health Organization (WHO) refers that every year are worn-out about 4% of the gross national products, with costs directly associated with professional diseases and accidents. The fungi dispersed through the atmosphere are susceptible to provoking disease to the Man when they enter in contact with the skin and mucous membranes, or by direct contact or by inhalation.

In Portugal, aerobiological studies are scarce and very few studies concerning of the atmospheric concentration and diversity of microorganisms that exist in the air of hospitals and other clinical have been carried out. Bearing in mind that the Decree-Law nº 79/2006 of 4 April regulates the levels of concentration of microorganisms, and thus it should be an important reference in evaluation the results. This work aimed to identify filamentous fungi isolated from indoor air, in two hospitals.

The identification of fungal can be a difficult task if based exclusively on morphologic and cultural characters. In that respect, the application of molecular methods, especially those based on PCR, can represent a great help. RFLP of ITS rDNA is proposed as a useful tool for molecular identification of the most common species fungal of airborne.

They are useful instruments for the increase of the knowledge of the pathological agents, as well as for the increment of the treatment capacity and prevention. The fungi contamination in health facilities has shown various infection caused by several species of *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium*.

Our study has identified an *Aspergillus* genus that may be involved in nosocomial infections, possibly related to the ventilation system, air filters, exhaust fans and movement of people in critical care units. Moreover, it can be said that the number of surgeries did not influence the amount of the number of fungi detected.

While in hospital A occur opportunistic fungi contaminants of air and genus *Rhodotorula* (yeast). Hospital B presents particularly *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. and *Penicillium* sp. which are mainly involved in the genesis of asthma and allergic alveolitis and the genus *Pichia* (yeast).

In both hospitals the species with the highest representation were *Cladosporium*, *Penicillium* and *Botrytis*.

ÍNDICE GERAL

	Página
Resumo	iv
Abstract	v
Índice Geral	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii

1.INTRODUÇÃO GERAL

1.1.Qualidade do ar	3
1.2.Legislação	4
1.3.Dispersão de fungos	6
1.4.Fungos no ambiente Hospitalar	7
1.5. Infecções causadas por fungos	9
1.6. Identificação dos fungos	10
1.7.Objectivos	14

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1.Amostra	17
2.2.Isolamento e purificação dos fungos	17
2.3.Extracção de DNA	18
2.4. MSP-PCR – Microsatellite primed-Polymerase Chain Reaction	20
2.5.Electroforese de DNA.	21
2.5.1.Electroforese em gel de agarose	21
2.5.2.Visualização do DNA	21
2.6. ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis	21

2.6.1.Digestão dos produtos PCR	22
2.6.2.Análise computacional	22
2.7.Purificação dos produtos de PCR	23
2.8.Sequenciação da região ITS	23
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1. Amostragem	26
3.2. MSP-PCR	30
3.3. ARDRA	30
3.4. Análise dos perfis de restrição	32
3.5. Resultado da análise da base de dados GenBank	36
3.5.1. Espécie/Gênero de fungos no Hospital A	36
3.5.2. Espécie/Gênero de fungos no Hospital B	39
3.5.3 Comparação dos resultados obtidos no Bloco Operatório do Hospital A e do Hospital B	40
4.CONCLUSÕES	49
5.PERSPECTIVAS FUTURAS	53
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1.INTRODUÇÃO GERAL	
Figura 1 – Representação esquemática dos ciclos da PCR	12
Figura 2 – Representação esquemática da região ribossomal eucariótica	13
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Figura 3 – Representação de distribuição do número de fungos no BO do Hospital A	27
Figura 4 – Representação de A a D da distribuição do número de fungos do SCE do Hospital A	28
Figura 5 – Representação da distribuição do número de fungos no BO do Hospital B	28
Figura 6 – Diversidade de alguns fungos mesófilos isolados do ar dos dois hospitais	29
Figura 7 – Resultado obtido pelo método MSP-PCR com o primer (GTG) ₅	30
Figura 8 – Resultado obtido pelo método ARDRA	31
Figura 9 – Resultado do produto de digestão do Hospital A	32
Figura 10 – Resultado do produto de digestão do Hospital B	32
Figura 11 – Dendrograma resultante de análise UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Dice	33
Figura 12 – Análise de similaridade dos perfis ARDRA utilizando o coeficiente de similaridade de Dice	35
Figura 13 – Representação da distribuição de A a C em percentagem dos fungos da zona esterilizada	37
Figura 14 – Representação da distribuição dos fungos em zona suja e da zona de referência	38
Figura 15 – Representação da distribuição em percentagem do género fúngico no Hospital A	39
Figura 16 – Representação da distribuição de A a D em percentagem do género fúngico do BO	40
Figura 17 – Distribuição do número de cirurgias e a quantidade de fungos (UCF/m ³) no Hospital A e Hospital B	41

Figura 18 – Distribuição da temperatura °C de cada colheita no BO nos dois hospitais 42

Figura 19 – Distribuição da humidade em percentagem em cada colheita nos dois hospitais 42

Figura 22 – Representação da relação da distribuição da quantidade de fungos, temperatura e humidade nos dois hospitais 43

Figura 21 – Representação do resultado das colheitas em percentagens do género fúngico no BO dos dois hospitais 44

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1.INTRODUÇÃO GERAL	
Tabela 1 – Parâmetros estabelecidos pelo Decreto-Lei nº 79/2006, para a qualidade do ar interior	6
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Tabela 2 – Identificação dos isolados através da base de dados	34
Tabela 3 – Quantidade de fungos isolados por espécie no BO do Hospital A	36
Tabela 4 – Quantidade de fungos isolados por espécie no SCE	36
Tabela 5 – Quantidade de fungos isolados por espécie no BO do Hospital B	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
BO	Bloco Operatório
C	Corredor (referência)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CIA	Clorofórmio Álcool Isoamílico
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amónia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dH₂O	Água Destilada
ddH₂O	Água Bidestilada
dNTPs	Dinucleótidos
E	Zona Esterilizada
ETS	External Transcribed Spacer
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IGS	Intergenic Spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer
Min.	Minuto
MSP	Microsatellite-primed Polymerase Chain Reaction
NHOAc	Acetato de Amónia
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSMA	Administração do espaço e segurança no trabalho (Occupational Safety and Health Administration)
PDA	Agar dextrose de batata
PIB	Produto Interno Bruto
RCBA	Agar Rosa Bengala Cloranfenicol
PCR	Reacção Polimerase em Cadeia
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
rpm	Rotações por minuto
S	Zona Suja
SCE	Serviço Central de Esterilização
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SSRs	Sequências Simples Repetidas

TES Tris-Hcl, EDTA e SDS

1. INTRODUÇÃO GERAL

Conforme consta no relatório da comissão do ambiente, da saúde pública e de segurança alimentar do Parlamento Europeu, estima-se que 8% a 12% dos doentes internados em hospitais sejam vítimas de acontecimentos adversos durante o seu tratamento. As infecções associadas aos cuidados de saúde afectam em média um doente em cada vinte, ou seja, 4,1 milhões anuais e tendo como consequência cerca de 37 000 mortes (Sartori 2009).

O mesmo relatório refere que as infecções associadas aos cuidados de saúde figuram entre as causas de prejuízo involuntário mais frequentes e mais nefastas (Sartori 2009). Uma segurança ineficaz dos doentes constitui um dos problemas mais graves de saúde pública e representa um pesado ónus económico para os limitados recursos de saúde, já que uma grande parte dos acontecimentos adversos e passíveis de prevenção, quer no sector hospitalar quer nos cuidados primários, parecem na sua maioria dever-se a factores sistémicos (Sartori 2009).

Finalmente refere, também, que os estudos da Comissão Europeia confirmam ser possível uma redução anual dos acontecimentos adversos em cerca de 20% dado o bom domínio dos meios de luta contra as infecções e a sua rápida execução. É assim importante assumir o objectivo de alcançar essa redução nos Estados-Membros até 2015 (Sartori 2009).

1.1. QUALIDADE DO AR

A qualidade do ar no interior dos edifícios depende de vários factores físicos, químicos e biológicos. Os materiais de construção, o sistema de ventilação e as condições climáticas podem levar a um aumento das concentrações de microrganismos cerca de duas a cem vezes superior ao do ar exterior (Nunes et al. 2008).

Durante os últimos 30 anos as preocupações associadas à qualidade do ar interior em ambientes fechados (escritórios, escolas, hospitais) aumentaram de uma forma exponencial devido à permanência cada vez mais prolongada das populações em locais fechados, acarretando a prevalência dos riscos na saúde Humana. Para otimizar o consumo de energia, os ambientes fechados têm sofrido alterações, determinando que a maior parte desses ambientes se encontrem herméticos. Recorrendo à tecnologia, os materiais utilizados tanto na construção como no manuseamento dos sistemas de aquecimento, ventilação e ar condicionado modificam a qualidade do ar interior. A

deficiente qualidade do ar representa um perigo para a saúde humana e desta situação pode resultar uma sintomatologia inespecífica compatível com vários diagnósticos tais como: cefaleias, fadiga, níveis variáveis de irritabilidade, irritação da pele, congestionamento nasal, irritação e náuseas (Santilli 2003, Weinstein 1998, Sidrin and Moreira 1999, Gomes 2002).

A qualidade de vida das pessoas depende da qualidade do ar externo e interno que respiram. Nos centros urbanos as pessoas passam cerca de 80% do tempo em ambientes fechados, em que a qualidade do ar é uma referência para o bem-estar físico, psíquico e biológico. Também a qualidade do ar interior nos Centros Hospitalares pode afectar a saúde dos seus utentes e profissionais de saúde devido ao longo período de permanência.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) refere que todos os anos é gasto cerca de 4% do Produto Interno Bruto (PIB) com custos directamente associados a doenças profissionais e acidentes de trabalho. Todavia, com uma política adequada haveria uma redução significativa do orçamento das finanças públicas e nacionais para este tipo de despesas. Ou seja, no caso de Portugal este custo poderá significar um total de quase 5 mil milhões de euros anuais (referente ao PIB de 2005) (Santos Joana ... [update 2009]).

A OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*), organismo governamental americano que regula e estabelece as políticas relativas à segurança e saúde no trabalho, refere que se existir investimento na segurança e saúde no trabalho, os custos diminuem cerca de 20 a 40%, sendo também indicadores de uma melhoria no local de trabalho, seja escola, escritório ou hospital (Santos Joana ... [update 2009]).

Em 2008, o Departamento dos Serviços ao Homem na Segurança - (EUA) publicou um guia prático que facilita a desinfecção e esterilização do hospital (Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities) através do HICPAC (Infection Control Practices Advisory Committee) com a finalidade de recomendar o método de limpeza desinfecção e esterilização, de forma a reduzir as infecções por microrganismos e a sua resistência às terapias administradas (William et al. 2008).

1.2. LEGISLAÇÃO

Os fungos existem dentro e fora das casas. O frio e os climas frios e secos podem reduzir a quantidade de esporos nas amostras exteriores, mas as condições no interior podem continuar favoráveis ao crescimento não sazonal dos fungos. Os ambientes

fechados e a exposição prolongada e contínua de indivíduos com o sistema imunitário vulnerável a agentes contaminantes, aumenta o risco de os fungos se tornarem patogénicos e nalguns casos, patogénicos oportunistas. Alguns estudos têm tentado relacionar o nível de poluição por fungos com a ocorrência de doenças específicas entre pacientes e equipas hospitalares (Morawska 2006; Nunes et al. 2005; Redd 2002).

Frequentemente, a literatura médica não apresenta linhas de orientação nas concentrações de fungos que envolvem os ambientes hospitalares, embora alguns autores tenham sugerido que, para *Aspergillus*, a concentração de protecção no ar deve ser menor que 5 UFC/m³ (Perdelli et al. 2006).

Em Portugal, os estudos aerobiológicos são escassos e, tanto quanto se conhece, existem poucos estudos que avaliem a concentração atmosférica e diversidade dos microrganismos existentes no ar de hospitais e outras instalações clínicas (Araújo et al 2008; Nunes et al. 2008). A legislação portuguesa sobre a contaminação do ar é inespecífica como também não existe normas para a monitorização do ar filtrado. Contudo, o Decreto-Lei nº 79/2006, de 4 de Abril, que regulamenta os níveis de concentração máxima de microrganismos (bactérias e fungos) para todos os tipos de interiores determina 500 UFC/m³ para bactérias e fungos. Esta é uma lei geral não referindo locais mais específicos como os hospitais.

O documento da OMS (Organização Mundial de Saúde) estabelece recomendações sobre a higiene das mãos nos cuidados de saúde (Pittet et al. 2009). A Comunidade Europeia propõe normas para aplicação em cada país procurando estabelecer os requisitos de higiene em estabelecimentos hospitalares (Santori 2009). Este documento recomenda que o limite da contagem aeróbia total reflita o nível de concentração de bactérias sendo um indicador da qualidade microbiológica do ambiente.

Existem várias recomendações, mas nenhuma técnica de amostragem ou método de análise têm sido implementados e a relação entre os níveis de microrganismos na atmosfera e os índices de infecções não estão bem definidos.

Tabela 1 – Parâmetros estabelecidos pelo Decreto-Lei nº 79/2006, de 4 de Abril, para a Qualidade do Ar Interior.

Parâmetros	Concentração Máxima de Referência
Partículas em suspensão	0,15 mg/m ³
Dióxido de Carbono	1800 mg/m ³
Monóxido de Carbono	12,5 mg/m ³
Ozono	0,2 mg/m ³
Formaldeído	0,1 mg/m ³
Compostos orgânicos voláteis	0,6 mg/m ³
Microrganismos-bactérias	500 UFC/m ³
Microrganismos-fungos	500 UFC/m ³
<i>Legionella</i> (*)	100 UFC/m ³
Radon(*)	400 Bq/m ³
(*) se aplicável	

Por outro lado, a nível internacional reconheceu-se a importância do problema, sendo a legislação muito mais rigorosa, embora não exista consenso sobre a maneira de monitorizar o ar filtrado nas instalações hospitalares. Na Europa, os limites variam entre 20 UFC/m³ e os 180 UFC/m³ para o bloco operatório em funcionamento. Em França os valores recomendados pela Direcção Geral de Saúde são de 20 UFC/m³ (CTIN 2002), sendo na Suíça de 25 UFC/m³ (Landin et al. 2005) e no Reino Unido de 180 UCF/m³ (Dharan et al. 2002).

Para esse efeito podem ser recolhidos fungos e bactérias utilizando filtros e crivos ou precipitação em água com transferência subsequente dos depósitos para um meio agarizado (Godish et al. 2004).

1.3. DISPERSÃO DE FUNGOS

A atmosfera contém gases, gotas de água, partículas microscópicas de pólen, poeiras e ainda microrganismos (bactérias e fungos) (Jones et al. 2004). Os fungos dispersos através da atmosfera são susceptíveis de provocar doenças ao Homem quando entram em contacto com a pele e mucosas, quer por contacto directo quer após a

sua inalação (Nunes et al. 2008). A exposição a bio-aerossóis, que se propagam no ar, contendo microrganismos e os seus respectivos produtos, podem causar problemas respiratórios e outros problemas de saúde como, por exemplo, infecções, hipersensibilidade pulmonar e reacções alérgicas (Vanhee et al. 2005).

Como já foi referido, a dispersão dos fungos através do ar ocorre sob a forma de aerossóis e a sua agressividade depende, em grande parte, da sua dimensão, uma vez que as partículas com mais de 18 μm de diâmetro ficam retidas no tracto respiratório superior, enquanto as partículas inferiores a 5 μm podem atingir os brônquios (Trabulsi 2001).

Nos bio-aerossóis as partículas têm, geralmente, um diâmetro 0,1-10 μm , contudo, o tamanho da fracção respiratória varia entre 1-10 μm . Os bio-aerossóis que têm dimensões entre 0,1- 0,5 μm mantêm-se normalmente no ar, enquanto as partículas maiores se depositam na superfície (Gorny 2004).

Existem factores físicos e ambientais que afectam a propagação dos aerossóis, sendo os parâmetros mais importantes as correntes de ar, a humidade relativa e a temperatura e o parâmetro físico mais significativo o tamanho da partícula, a sua densidade e forma (Stezenbach et al. 2004).

Os fungos que têm dispersão aérea são denominados anemófilos, possuindo a capacidade de colonizar diferentes substratos e habitats de forma simples e muito eficiente. Fungos anemófilos constituem os principais contaminantes no ar de ambientes fechados, podendo promover e desencadear processos alérgicos, irritação em mucosas e pele, infecções (Lobato et al. 2007).

1.4. FUNGOS NO AMBIENTE HOSPITALAR

A presença de fungos no meio hospitalar é uma preocupação constante no combate das infecções por agentes oportunistas e um problema de saúde pública já que as condições hospitalares levam ao desenvolvimento de fungos independentemente da estação do ano. O meio ambiente hospitalar, a susceptibilidade dos indivíduos, a permanência prolongada e contínua a agentes contaminantes, o conteúdo enzimático e a capacidade antigénica de cada fungo são factores de risco para contrair uma infecção (Zhou et al. 2000). Isto é particularmente grave em cenários operatórios e as contaminações biológicas do ar em salas de operações são, geralmente, considerado um

factor de risco que potencia o aparecimento de infecções pós-operatórias em cirurgias limpas (Landin et al. 2005).

Existem entre 50.000 a 250.000 espécies de fungos, das quais cerca de 100.000 são fungos saprófitas. A maior parte são fungos filamentosos inofensivos, mas 200 espécies de fungos filamentosos podem ser patogénicos oportunistas para o Homem e encontram-se distribuídos por vários grupos taxonómicos (Redd 2002).

A dualidade dos fungos oportunistas/patogénicos, o manuseamento deficiente dos materiais hospitalares e a susceptibilidade de cada indivíduo, levam ao aumento de infecções. Quanto à forma de propagação, as infecções hospitalares podem ser classificadas em cruzadas, propagadas de indivíduo a indivíduo e pós-operatórias.

O padrão infeccioso varia com os diferentes hospitais e, por vezes, de uma região geográfica para outra. Hospitais com cirurgias electivas, tais como os de ortopedia, apresentam uma menor proporção de infecções do que aqueles em que existem serviços de diferentes especialidades onde os doentes têm maior probabilidade de sofrerem infecções. Frequentemente as infecções contraídas nos hospitais só são tornadas clinicamente evidentes depois de o doente ter alta (Cruickshank and Swain 1973).

A denominação “fungos contaminantes” em micologia médica tem uma conotação duvidosa visto que, em algumas situações, os fungos ditos contaminantes são passíveis, na dependência do hospedeiro, de causar quadros clínicos tão ou mais severos que os patogénicos clássicos, podendo levar o paciente, em algumas ocasiões, à morte.

Desta forma, classificam-se como fungos contaminantes uma diversidade de géneros fúngicos que colonizam o ambiente produzindo grande quantidade de estruturas reprodutivas (esporos) que, por sua vez, são veiculadas por correntes aéreas dispersando-se com extrema facilidade e, por conseguinte, podendo contaminar meios de cultura para isolamento primário em micologia.

A importância dos fungos contaminantes não está ligada apenas a uma contaminação por via aérea mas, também, vincula-se às contaminações de materiais clínicos colectados de sítios anatómicos não estéreis que, durante a colheita, não tenham passado por uma anti-sepsia adequada, favorecendo assim, a vinculação desse organismo para o meio de cultura primário e consequentemente, dificultando o crescimento do verdadeiro agente (Sidrim and Moreira 1999). Por isso, a monitorização do ambiente para detectar potenciais focos patogénicos para prevenir epidemias e proteger a saúde pública requer uma abordagem rápida, sensível e de confiança que permita detectar microrganismos (Zhou et al. 2000).

A taxonomia dos fungos filamentosos baseia-se na sua identificação com base nas características morfológicas das estruturas reprodutivas (sexuadas e assexuadas). Desta forma, para se identificarem estas estruturas, os isolados devem ser cultivados a partir de colónias puras em meios de cultura apropriados.

As colónias de fungos desenvolvem-se necessitando de uma incubação por vários dias ou semanas para que se tornem visíveis as suas características. Estas características podem ser muito variáveis. O crescimento é levado a cabo por incubação num meio de cultura específico, empregando gelose peptonada glucosada, pH 6, com cloranfenicol durante dias, levada a cabo numa estufa a 25°C ou a 37°C (Fell 1997).

O conhecimento básico dos factores de crescimento é essencial para permitir o controlo em laboratório das culturas fúngicas, devendo esses isolamentos serem estáveis e reprodutíveis (Landrin et al. 2005).

1.5. INFECÇÕES CAUSADAS POR FUNGOS

A contaminação por fungos em locais fechados como escolas, escritórios, casas e hospitais tem sido objecto de vários estudos. Fungos em instalações de saúde têm provocado infecções hospitalares: *Candida albicans* e várias espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* (Araujo et al. 2008, Perdelli et al. 2006; Kuhn 2003) já foram descritas. Embora os fungos estejam dispersos no ambiente, estes raramente causam problemas aos humanos graças ao seu mecanismo de defesa. Contudo, a redução do sistema imunitário do hospedeiro devido a cancro, doenças hemolinfoproliferativas, infecções HIV, terapias ou condições particulares como transplantes, pode conduzir à multiplicação descontrolada de fungos e, conseqüentemente, à infecção (Kuhn et al. 2003).

Os fungos filamentosos presentes no meio ambiente hospitalar, podem causar infecções nosocomiais em doentes susceptíveis. O género *Aspergillus* (*A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*) é o mais citado na literatura como fungo oportunista, especialmente em doentes transplantados (medula óssea). A inalação de esporos é a via mais comum de transmissão. A doença pulmonar e, mais raramente, a sinusite aspergilar são as manifestações mais comuns de aspergilose invasiva (Sidrim and Moreira 1999).

Outros géneros, tais como *Fusarium*, *Acremonium* e *Penicillium* são capazes de causar formas localizadas ou disseminadas de infecção hospitalar. Outros grupos de fungos filamentosos, como os Zigomycetes (*Rhizopus* sp., *Mucor* sp.), caracterizados por

possuírem hifas não septadas (cenocíticas) podem também ser agentes de infecção hospitalar (Augustowska 2006).

Agentes como *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e espécies de Zigomycetes são conhecidos como causadores de enfermidades disseminadas, endocardite, infecções pulmonares, queratites, entre outras, em doentes imunodeprimidos (Singh et al. 1994).

Os problemas de saúde relacionados com a exposição a fungos envolvem não só pacientes imunodeprimidos mas, também, pessoas saudáveis que poderão sofrer de hiper-reactivada respiratória, asma e alveolites alérgicas. Com o aparecimento da terapia com antimicrobianos de largo espectro e o tratamento de doentes com doenças metabólicas crónicas, neoplásicas e transplantados em uso de agentes citotóxicos e imunossupressores, além da SIDA, a diferença entre fungos contaminantes e patogénicos (classicamente os agentes de micoses superficiais, subcutâneas e profundas), tornou-se pouco clara (Weinstein 1998).

Aspergillus fumigatus, por exemplo, um fungo saprófita que se encontra em vários tipos de ambiente, causa frequentemente alergias, principalmente, alergias broncopulmonares – aspergiloses. Outros fungos como *Rhizopus*, *Cladosporium* e *Penicillium*, causam problemas respiratórios (Denning et al. 2006). Em particular *Aspergillus* e *Penicillium* estão sobretudo envolvidos na génese da asma e alveolites alérgicas (Denning et al. 2006).

Segundo alguns autores (Robine et al. 2005; Mobin et al. 2006; Green et al. 2006; Garcia et al. 2006) os microrganismos mais frequentes em ambientes fechados como por exemplo, hospitais, casas e biotérios são: *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Pneumocystis carinii*, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e *Alternaria* sp..

1.6. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

A identificação das espécies de fungos, assenta essencialmente nas dimensões e características morfológicas dos esporos, incluindo: tamanho, forma, cor, septação, espessura e textura das paredes.

Os fungos que se reproduzem sexualmente são classificados nas divisões Zigomicota, Ascomicota e Basidiomicota, consoante as estruturas reprodutivas que dão origem. Os que se conhece apenas a reprodução assexuada, pertencem à classe Deuteromicetes, mas logo que se encontre a sua forma sexuada, serão transferidos para os Ascomicota ou Basidiomicota (Ferreira and Sousa 2000).

A classificação tradicional dos fungos tem sido feita com base na morfologia comparativa das estruturas sexuais. O conceito mais recente na classificação dos fungos foi a abolição de uma categoria individual para os muitos fungos que não têm reprodução sexuada conhecida. Estes fungos eram classificados na divisão Deuteromycota, mas com os dados ultra – estruturais da parede e dos septos fúngicos e a informação molecular, esta categoria tem vindo a ser rejeitada por alguns micologistas (Ferreira and Sousa 2000).

Os fungos podem reproduzir-se de forma assexuada (por diferenciação do micélio) ou de forma sexuada (por fusão de núcleos haploides, com formação de um zigoto sexual).

Algumas estruturas fúngicas podem ser observadas a olho nu. Estruturas relacionadas à reprodução, principalmente sexuada, são importantes, visto a classificação taxonómica dos fungos se baseia nesses achados. Contudo, quando a forma de reprodução sexuada não é detectada, a classificação é baseada nos órgãos de reprodução assexuada. Frequentemente, na ausência de expressão de pelo menos numa dessas formas de reprodução, a classificação torna-se quase impossível.

Devido às dificuldades da identificação dos fungos recorrendo exclusivamente à morfologia, é necessário recorrer ao estudo do seu genótipo recorrendo à aplicação de técnicas moleculares baseadas na análise de fragmentos de ácidos nucleicos, por electroforese, com a análise de microssatélites e, ainda, com a utilização de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos (Cooper 2005).

As técnicas baseadas no DNA proporcionam marcadores práticos de identificação molecular para um amplo leque de espécies de fungos.

Uma das técnicas mais importantes desenvolvidas para estudos de marcadores moleculares é a PCR (Reacção da Polimerase em Cadeia) que consiste numa amplificação do DNA molde (Figura 1).

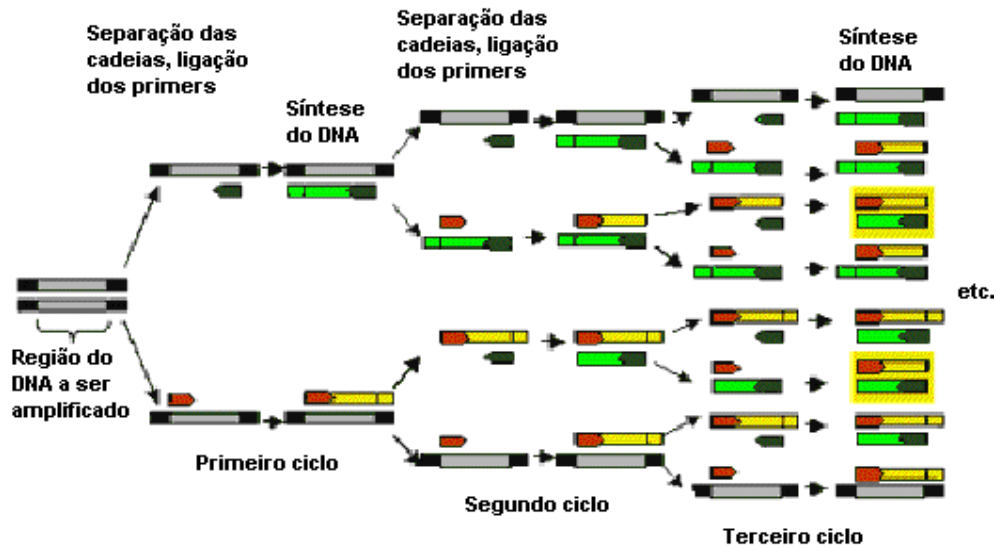


Figura 1 - Representação esquemática de ciclos PCR. Adaptado de www.e-escola.pt/topico.asp?hid=339-31_04_09.

A análise de microssatélites é baseada na amplificação de sequências simples repetidas (SSRs) presentes no genoma de eucariotas - microssatélites, utilizando *primers* específicos (Zhou et al. 2000). Os marcadores SSRs, são regiões de DNA que incluem um número variável de sequências repetidas consecutivas de 2 a 6 pares de bases (pb). O método tem um elevado potencial de discriminação, grande versatilidade relativamente à complexidade do DNA, rápida análise do genoma utilizando poucas sondas multi-locus e excelente reprodutibilidade. A sua elevada sensibilidade e a possibilidade de análise rápida do genoma com poucas sondas levou à identificação de multi-locus na análise de ligação e mapeamento de genoma em fungos (Raton 2004).

A maioria das análises taxonómicas centra-se, também, no DNA ribossomal (rDNA). Os genes de rDNA possuem cópias múltiplas (8-12 kb) distribuídas em sequências que codificam subunidades do RNA das moléculas do ribossoma. Em cada sequência existem genes que codificam as subunidades pequenas e as maiores. Externamente às sequências maiores e mais pequenas do RNA, existem espaços de transcrição externa (ETS) e espaços intergénicos (IGS). Entre as sequências maiores e as mais pequenas do rRNA encontram-se os Internal Transcribed Spacer (ITS1 e ITS2). O gene 5.8S do rDNA está localizado entre o ITS1 e o ITS2 (Figura 2).

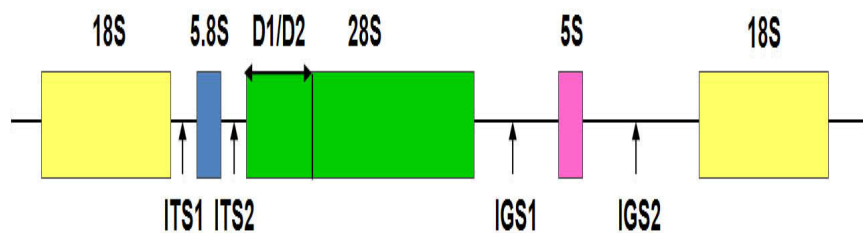


Figura 2 – Representação esquemática da região ribossomal eucariótica.

As regiões do ITS são altamente conservadas na maioria das espécies com similitudes intra-específicas, mas são variáveis entre espécies, tornando-se, assim, úteis em taxonomia. Os *primers* são utilizados para reconhecer um *locus* específico do rRNA dos fungos, aumentando a sua sensibilidade e a selectividade para a identificação das espécies (Prewit et al. 2008, Dupont et al. 2006).

O PCR-FRLP é um método de DNA *fingerprinting* que se baseia na análise de padrões derivados da clivagem de uma sequência de DNA com enzimas de restrição. Através da digestão por enzimas de restrição é possível a identificação dos genótipos, a análise da diversidade genética, a estimativa de relacionamento genético e o mapeamento genético.

Este método é rápido, simples e sensível e requer pequenas quantidades de DNA, possibilitando a análise rápida de um elevado número de espécies. O método de ARDRA (*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis*), consiste na amplificação do próprio gene rRNA e subsequente acção de uma enzima de restrição sobre o produto de amplificação tendo como finalidade diferenciar espécies fúngicas com base nos perfis de restrição (Raton 2004).

O rDNA tem regiões altamente conservadas, que servem como pontos de referência para estudos de divergência evolutiva, alternados com regiões variáveis. O rDNA é subdividido em 3 subunidades (5,8S, 18S e 28S) que são transcritas com os espaços de transcrição interna e externa (ITS e ETS), sendo removidos posteriormente para formar ribossomas. Além destas regiões de transcrição, existem os espaços intergénicos (IGS) que separam as cópias em tandem nos cromossomas e que são transcritos (Figura 2), também podem ser utilizados (Strachan and Read 2000, McPherson and Møller 2006).

1.7. OBJECTIVOS

A presença de fungos no meio hospitalar é uma preocupação constante no combate das infecções por agentes oportunistas e um problema de saúde pública.

Em Portugal existem poucos estudos de concentração atmosférica e diversidade dos microrganismos existentes no ar hospitalar em particular no bloco operatório. Com este trabalho pretendeu-se a identificação dos fungos filamentosos isolados do ar interior em dois hospitais.

O objectivo geral deste estudo foi investigar a biodiversidade de fungos presentes no ar em salas distintas do bloco operatório de dois hospitais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRA

A amostragem foi executada numa sala operatória do Hospital A e do Hospital B. O Hospital A localiza-se na região Nordeste de Portugal, tendo como local de referência a zona onde os doentes são preparados para a cirurgia, chamada área de transferência e ainda no Serviço Central de Esterilização (SCE). O Hospital B localiza-se no Centro - Norte de Portugal e a amostragem realizou-se na sala do Bloco Operatório.

A amostragem do Hospital A consistiu em 8 colheitas de ar na sala do Bloco Operatório num período de 1 mês (Julho 2008) e no final de uma cirurgia, após desinfecção da sala e 3 colheitas no serviço de Esterilização ao longo 1 semana em Julho de 2008 (Anexo 1).

- Bloco Operatório (BO);
- Serviço Central de Esterilização (SCE):
- Serviço de esterilização: Corredor – zona de referência (C);
- Serviço de esterilização: zona limpa – inspecção, preparação, embalagem e preparação de têxteis (L);
- Serviço de esterilização: zona suja – descontaminação (S);
- Serviço de esterilização: zona esterilizada – esterilização e armazém de produtos estéreis (E).

As recolhas das amostras do Hospital B decorreram no local BO após higiene das superfícies do equipamento, chão e paredes (Anexo 2), duas vezes por semana num período de um mês, sendo o número (nº) total de colheitas de oito.

A amostragem nos dois hospitais foi descrita nas dissertações “ Microbiologia do ar: monitorização do ar em ambiente hospitalar” (Santos 2008) e “Avaliação Microbiológica do ar em ambiente hospitalar” (Silva 2008) no âmbito do Mestrado em Microbiologia da Universidade de Aveiro.

2.2. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Todos os meios de cultura utilizados foram autoclavados a 121°C, por um período de 20 minutos. Os meios de cultura utilizados foram o meio RBCA e o meio PDA. Para os meios utilizados é dada a composição para volumes de 1 litro:

Meios de cultura

RCBA (*Rose bengal chloranphenicol agar* - Merck):

Composição típica (g/L): peptona micológica 5,0; glicose 10,0; hidrogenofosfato dipotássico 1,0; sulfato de magnésio 0,5; rosa de bengala 0,05; cloranfenicol 0,1; agar-agar 15,5.

PDA (*Potato dextrose agar* – Merck):

Composição típica (g/L): infusão de batata 4,0; dextrose 20,0; agar 15,0.

As culturas foram mantidas inicialmente em RCBA para isolamento e purificação. Após a purificação, as culturas foram mantidas em PDA, a metade da concentração. As culturas foram incubadas à temperatura ambiente, por um período de 7 a 14 dias

2.3. EXTRACÇÃO DE DNA

Soluções utilizadas:

TE

10mM Tris-HCL

1mM EDTA pH 8,0

TAE 1x

40mM Tris base

40mM Ácido acético glacial 2mM EDTA pH 8,3

(Nota: solução “stock” preparada a 50x)

TES

100mM Tris pH 8

10mM EDTA pH 8

2% SDS (m/v)

CTAB a 10% (m/ v)

CIA

Clorofórmio e álcool isoamílico (24:1).

Enzimas para extracção de ácidos nucleicos

Proteínase K: solução “stock” preparada a 20 mg/mL em água; dividir em alíquotas e armazenar a -20°C.

Reagentes utilizados no PCR

GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin)

5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, Wisconsin)

MgCl₂ 25mM (Promega, Madison, Wisconsin)

dNTPs 2mM (Fermentas Vilnius, Lituânia)

Foram utilizados dois métodos para a extracção do DNA descritos em seguida:

Método de extracção do DNA segundo protocolo modificado de Möller et al (1992)

1. Raspar o micélio e colocar em microtubo 2 mL com 500 µL de tampão TES.
 2. Aquecer a 100°C durante 3 min.
 3. Adicionar 10 µL de proteinase K.
 4. Incubar a 65°C durante 30 minutos.
 5. Adicionar 140 µL de 5M NaCl e 65 µL CTAB a 10%.
 6. Incubar a uma temperatura de 65°C durante 30min.
 7. Adicionar 1000 µL de CIA e misturar por inversão e incubar no gelo durante 30 minutos.
 8. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a uma temperatura de 4°C.
 9. Recuperar a fase aquosa (800 µL) para um novo microtubo (2mL).
 10. Adicionar 225 µL de NH₄OAc 5M e colocar no gelo durante 30min.
 11. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a uma temperatura de 4°C.
 12. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo (1,5 mL) e adicionar 500 µL de isopropanol frio e misturar por inversão.
 13. Centrifugar 10 min a 12000 rpm a uma temperatura de 4°C.
 14. Retirar o sobrenadante e lavar o “pellet” com 500 µL de etanol (70% v/v) e misturar por inversão.
 15. Centrifugar 10 min a 12000 rpm e retirar o etanol.
 16. Após secagem solubilizar em 50-100 µL de TE.
-

Método rápido de extracção do DNA

1. Raspar o micélio com a ajuda de uma ansa.
 2. Colocar o micélio num microtubo de 1,5 mL com 50 µL de água estéril.
 3. Incubar a uma temperatura de 100°C durante 5 min.
 4. Colocar a 4°C ou a -20°C.
-

2.4. MSP-PCR – *MICROSATELLITE PRIMED – POLYMERASE CHAIN REACTION*

Neste procedimento de amplificação por PCR do DNA total dos fungos foi utilizado o *primer* (GTG)₅.

MSP-PCR – *Microsatellite Primed Polymerase Chain Reaction*

1. Preparar a seguinte reacção de amplificação

Reacção (25µL)

	Volume (µl)
ddH ₂ O	12,40
10xbuffer	5,00
MgCl ₂ 25mM	3,00
dNTPs 2mM	1,50
Primer GTG ₅	2,00
DNA molde	1,00
<i>Taq</i> polimerase 5U/µL	0,10

2. A reacção decorreu num termociclador My Cycler (Bio-Rad, Califórnia, USA). Iniciou-se com uma desnaturação a 95°C durante 2 minutos, seguindo-se 35 ciclos (desnaturação a 94°C, 1min; o emparelhamento a 50°C, 1min; extensão a 72°C, 30 min.) e uma extensão final de 10 min, a 72°C (Alves et al 2004)

3. Os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose (m/v) a 1,5% a uma voltagem de 100 V durante 1 hora em tampão TAE 1x.

2.5.ELECTROFORESE DE DNA

2.5.1.Eletroforese em gel de agarose

Prepararam-se géis de agarose à concentração de 1,5% para separar os vários fragmentos. A cada amostra foi adicionado tampão de carga 6x DNA Loading Dye (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Em cada gel foi incluído o marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Vilnius, Lituânia).

2.5.2.Visualização do DNA

Após a electroforese, coraram-se os géis durante cerca de 20 a 30 minutos numa solução de brometo de etídio (EtBr) a 5 µg/mL, em TAE. Quando necessário lavaram-se em água destilada para eliminar o excesso de EtBr. Após a coloração, visualizou-se o DNA num transluminador de luz UV sendo digitalizados com o sistema G: BOX da Syngene.

2.6. ARDRA – *AMPLIFIED RIBOSOMAL DNA RESTRICTION ANALYSIS*

A análise dos polimorfismos de restrição (PCR-RFLP) ao nível dos genes que codificam para rRNA foi realizada com o método que se descreve a seguir:

Amplificação de regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

1.Preparar a seguinte reacção de amplificação:

Reacção (25µL):

	Volume (µL)
ddH ₂ O	12,90
10xbuffer	5,00
MgCl ₂ 25 mM	3,00
dNTPs 2mM	1,50
Primer ITS5(10 pmol/µL)	0,75
Primer NL4(10 pmol/µL)	0,75
DNA molde	0,50
<i>Taq</i> Polymerase 5 U/µl	0,10

2. Amplificação das regiões ITS+D1/D2 decorreu num termociclador My Cycler (Bio-Rad, Califórnia, USA) de acordo com o seguinte programa de amplificação:

Desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguida de 35 ciclos (desnaturação a 94°C, 30s; emparelhamento a 50°C, 30 s; extensão a 72°C, 90 s) e uma extensão final de 10 min a 72°C.

3. Separar, por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) a uma voltagem de 80 V durante 1 hora em tampão TAE 1x.

2.6.1. Digestão dos produtos PCR

Submeteram-se os produtos de amplificação resultantes (ITS + D1/D2) a digestão com a enzima de restrição *HaeIII* (Fermentas, Vilnius, Lituânia).

A digestão foi realizada em volume de 10 µL, de acordo com a seguinte descrição:

ITS-FRLP

1. Reacção (10µL)

	Volume (µL)
ddH ₂ O	3,9
Tampão R ⁺ /BSA	1,0
Enzima <i>HaeIII</i>	0,1
rDNA	5,0

2. Incubar a reacção durante 14-16 horas (*overnight*), à temperatura de 37°C.

3. Separar por electroforese os produtos de digestão num gel de agarose a 2% (m/v) a uma voltagem de 100V durante 1h em tampão TAE1x.

2.6.2. Análise computacional

Os géis de agarose foram digitalizados com o sistema G:BOX da Syngene. Os padrões de bandas foram analisados com *software* GelcomparII (Applied Maths). Os géis foram normalizados utilizando os mesmos marcadores em ambos os lados. A opção *rolling disk* foi aplicada na remoção do background. As bandas de DNA foram detectadas pelo *software* e foram minuciosamente observadas visualmente para corrigir registos/dados insatisfatórios. As variações nas intensidades das bandas não foram consideradas como diferenças. Os graus de semelhança entre diversos perfis foram calculados com o coeficiente de similaridade de Dice. Foi gerado um dendrograma onde os perfis são agrupados pela sua similaridade. A análise de *clustering* das matrizes de

similaridade foi realizada pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*), utilizando uma otimização de 4,35% e tolerância de 1,3%.

2.7. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

A purificação dos produtos de PCR foi efectuada através do *kit* Jetquick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed, Germany).

Reacção de purificação

- 1.Preparação da amostra: adicionar 400 µL de solução (H1) à reacção de amplificação.
 - 2.Colocar uma coluna de purificação no tubo colector e adicionar a amostra.
 - 3.Centrifugar 1 minuto a 12000rpm.
 - 4.Descartar o líquido no fundo do tubo colector.
 - 5.Adicionar 500µL de solução (H2).
 - 6.Centrifugar 1 minuto e descartar o líquido no fundo do tubo colector.
 - 7.Eluição do DNA: colocar a coluna num tubo de 1,5mL. Adicionar 20 µL de ddH₂O pré-aquecida a 65°C, directamente no centro da coluna. Centrifugar durante 2 minutos. Retirar e descartar a coluna.
 - 8.Congelar a -20°C.
-

2.8. SEQUENCIAÇÃO DA REGIÃO ITS

A região ITS foi sequenciada utilizando o *primer forward* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG – 3'). Sempre que necessário o *primer* reverso ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') foi também usado.

Após obter as sequências, estas foram devidamente editadas utilizando o *software* FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc. <http://www.geospiza.com/finchty>). Em seguida utilizou-se a ferramenta BLAST para realizar uma pesquisa de similaridade contra a base de dados GenBank.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.AMOSTRAGEM

A concentração de fungos em ambos os hospitais encontra-se dentro dos valores exigidos pela legislação em vigor em Portugal, sendo inferior a 17 UFC/m³.

Das cinco salas do Serviço do Bloco Operatório, 1 sala foi do bloco operatório e 4 do serviço de esterilização, foram obtidas 81 amostras de fungos filamentosos (Figura 3 e 4)).

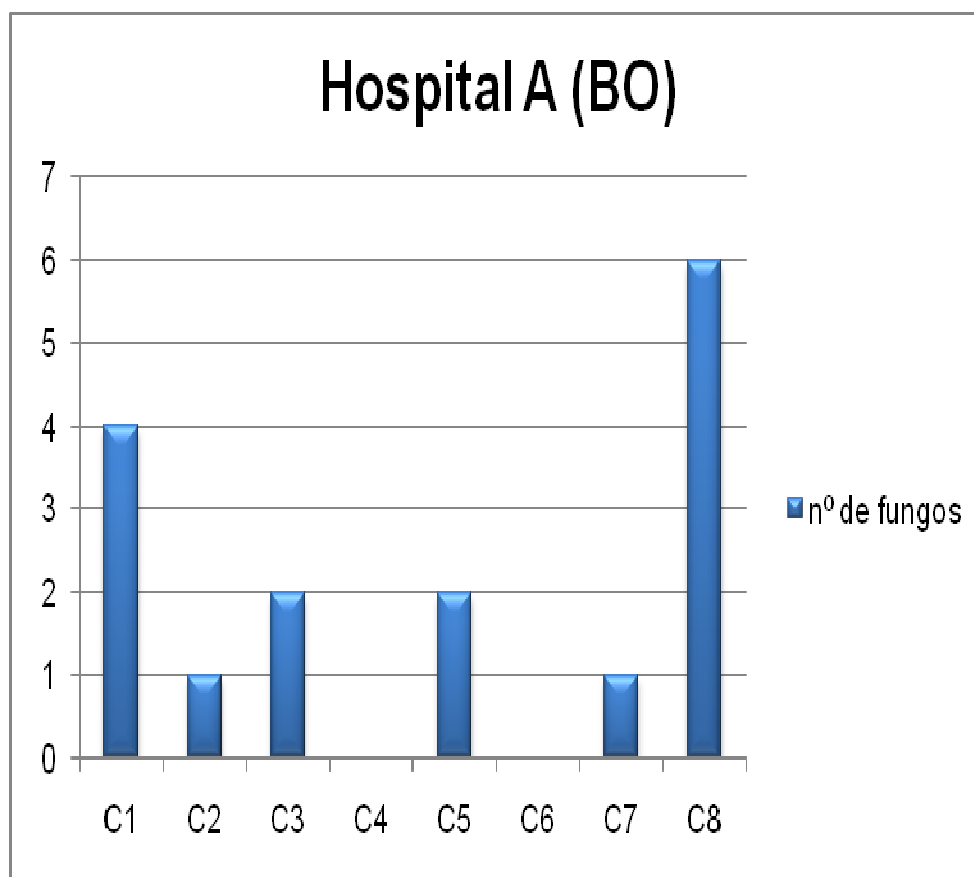


Figura 3 – Representação da distribuição do número de fungos no Bloco Operatório do Hospital A

Hospital A (SCE)

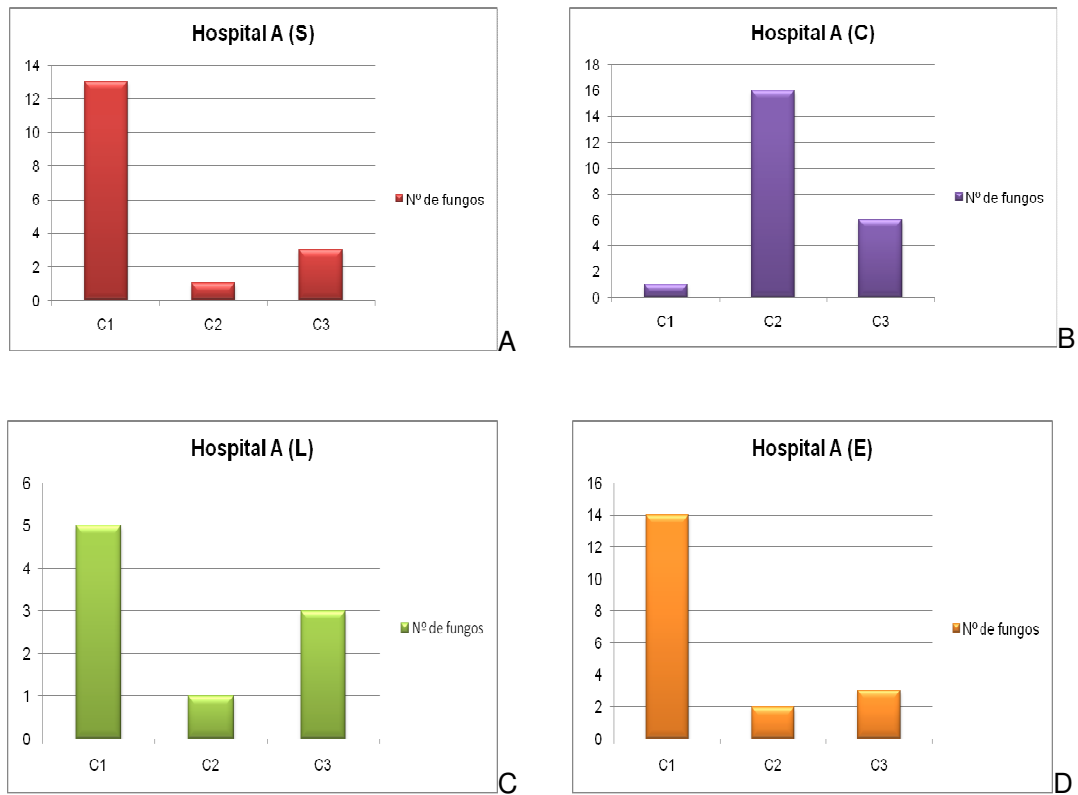


Figura 4 - Representação de A a D da distribuição do número de fungos do SCE do Hospital A

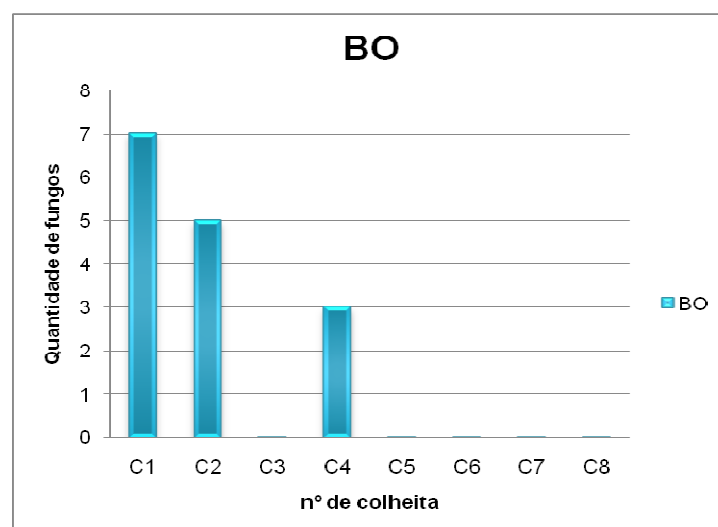


Figura 5 – Representação da distribuição do número de fungos no Bloco Operatório do Hospital B

Nos fungos isolados foi observada uma grande diversidade morfológica, em termos de aspecto macroscópico das colónias (Figura 6), o que pode indicar uma grande diversidade de espécies.

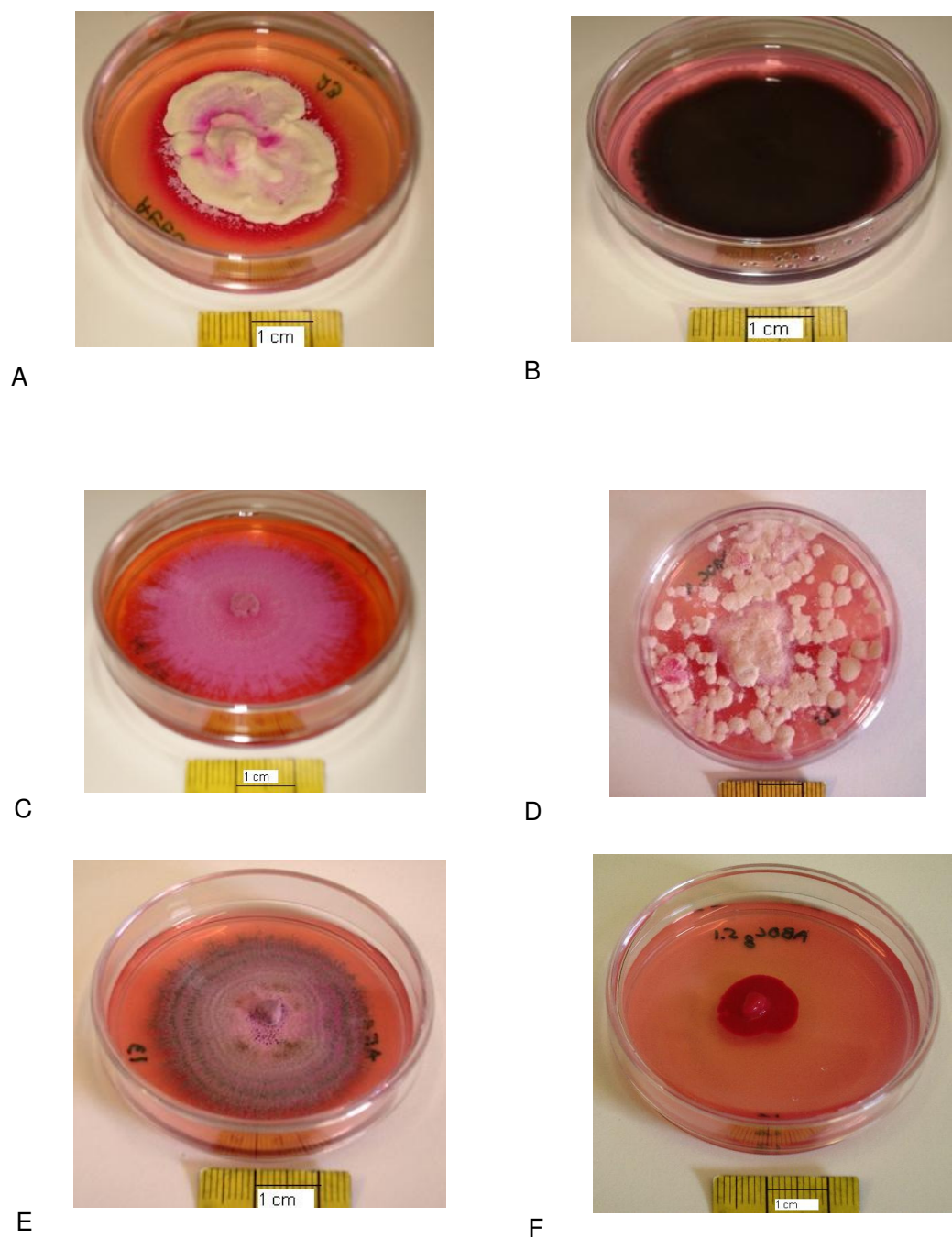


Figura 6 – Diversidade morfológica de alguns fungos mesófilos isolados do ar de dois hospitais. A – isolado da zona esterilizada, E – isolado da zona suja e F – isolados do bloco operatório do hospital A. B, C e D – isolados do hospital B do bloco operatório.

3.2. MSP-PCR

Através de tipagem molecular dos isolados com o *primer* (GTG)₅ não foi possível identificar os diferentes tipos ou perfis genéticos e agrupá-los pela sua semelhança (Figura 7).

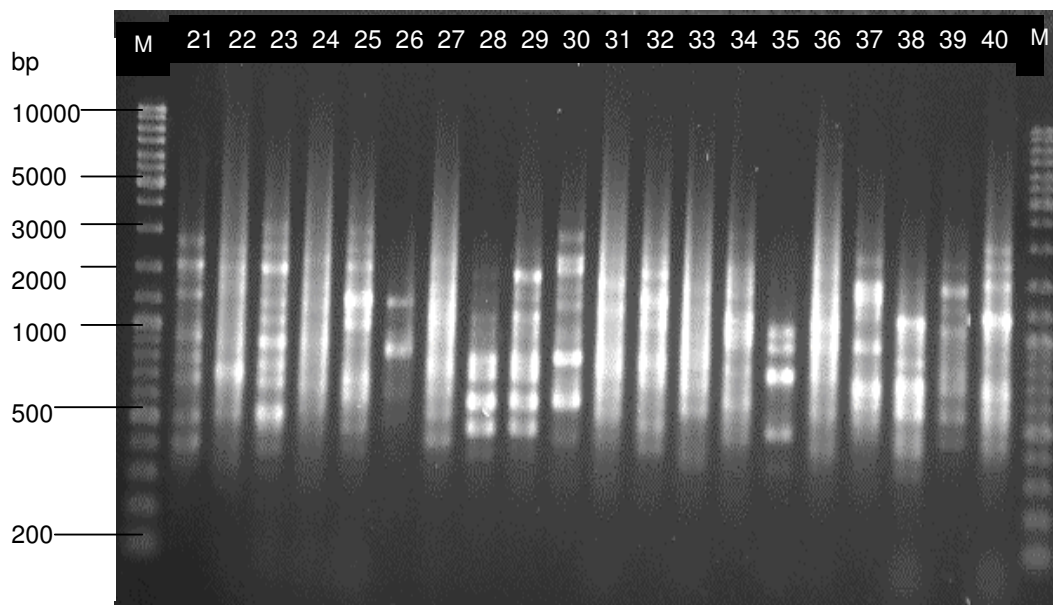


Figura 7 – Exemplo de resultado da amplificação MSP – PCR com o *primer* (GTG)₅.

Verificou-se uma grande diversidade de perfis de bandas de tamanho entre 200 a 3500 pb, o que levou à impossibilidade de os agrupar com base na semelhança dos mesmos (Figura 6).

Esta técnica revelou-se demasiado discriminatória para o objectivo do trabalho que era agrupar isolados de acordo com a similaridade dos perfis.

3.3. ARDRA

A técnica aplicada neste estudo consiste na amplificação de um fragmento da região rDNA contendo a região ITS, assim como os domínios D1/D2 do rDNA 28S seguida da digestão dos fragmentos com uma enzima de restrição.

Amplificaram-se todas as amostras com o *primer* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e com o *primer* reverso NL4 (5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3') (Figura 8).

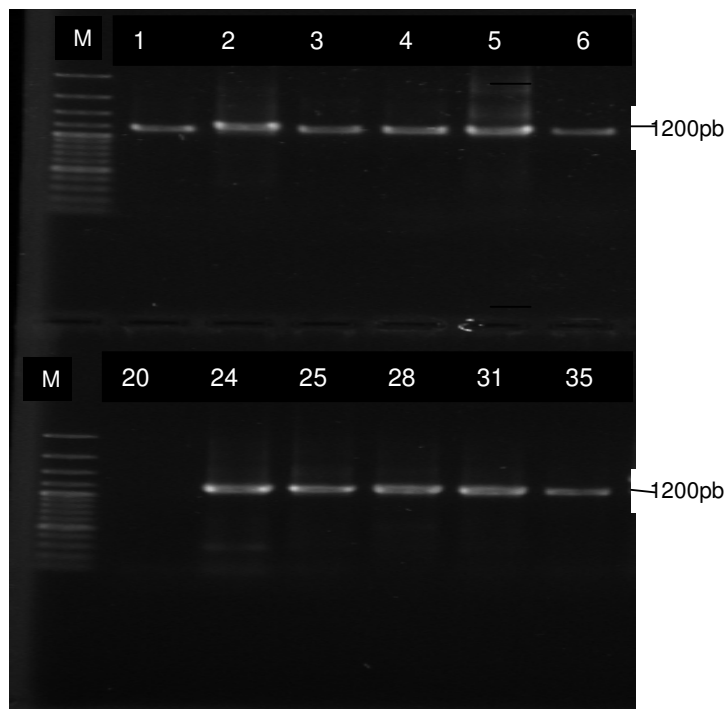


Figura 8 – Resultado da amplificação da região ITS.

Os *primers* ITS5 e NL4 deram origem a um amplicão com um tamanho aproximado de 1200pb (Figura 8) em todos os isolados. A digestão com *Hae*III deu origem a perfis de bandas excepto em dois casos dos isolados, com a identificação numérica 26 e 48. Resultou em perfis pouco complexos, com baixo número de bandas e mais fácil de interpretar. Estes perfis são, em princípio, específicos para cada espécie, ou seja, indivíduos de uma mesma espécie possuem o mesmo perfil de restrição (Figura 9 e 10).

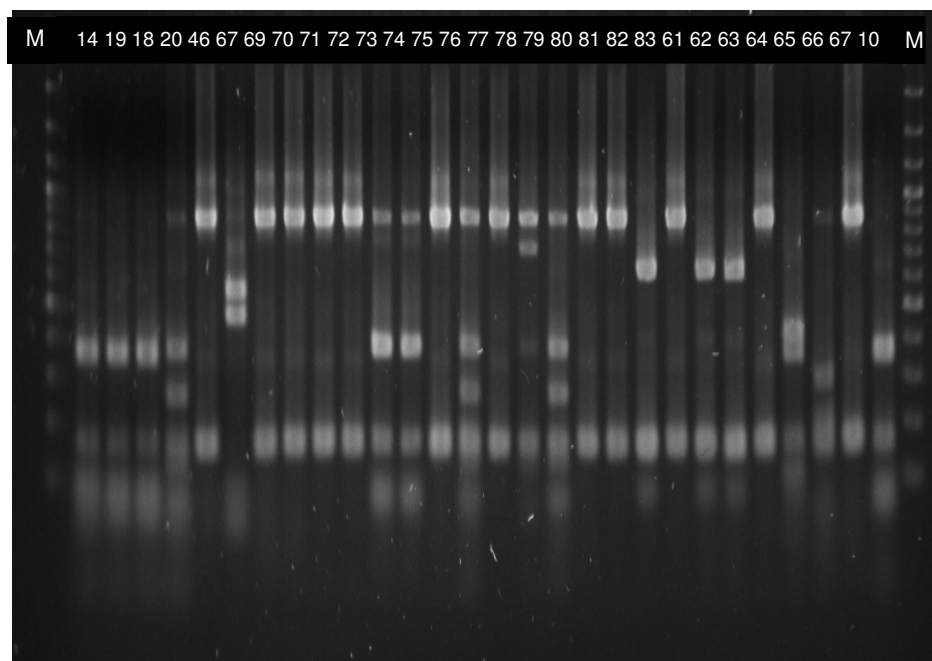


Figura 9 – Exemplo do resultado da amplificação de rDNA seguida da digestão com a enzima de restrição HAEIII dos isolados do Hospital A.

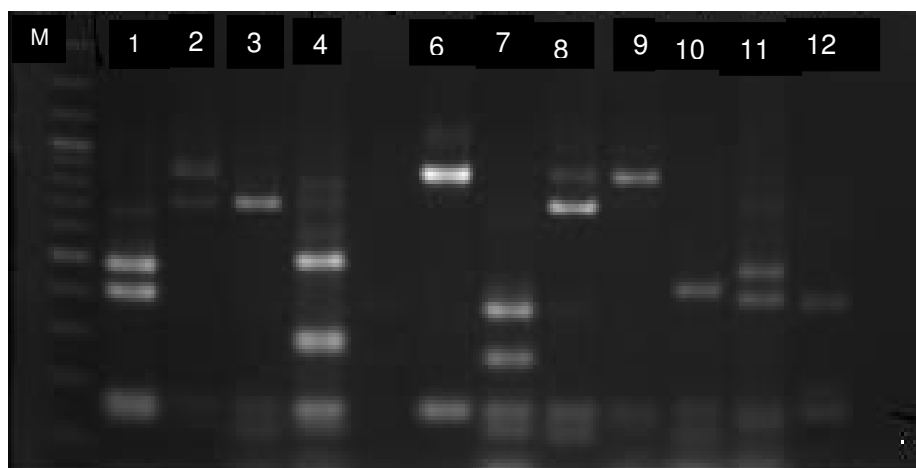


Figura 10 – Resultado da amplificação do rDNA seguida da digestão com a enzima de restrição *HaeIII* dos isolados do Hospital B do BO

3.4. ANÁLISE DOS PERFIS DE RESTRIÇÃO

O dendrograma é resultante da análise dos perfis de restrição (Figura 10). A partir desta análise foram seleccionados representantes de cada grupo para posterior identificação molecular (Figura 11).

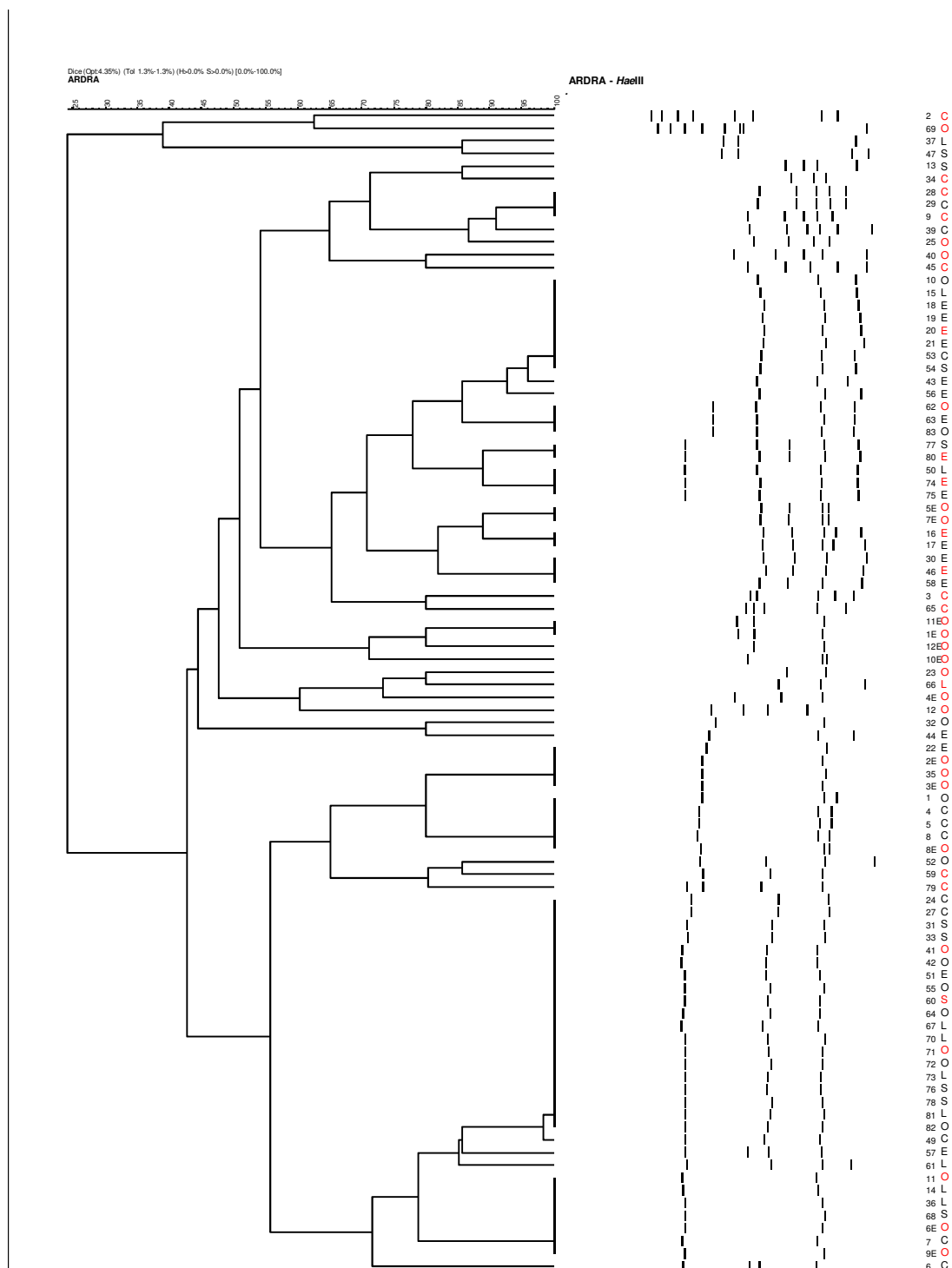


Figura 11 – Dendrograma resultante da análise UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Dice. O – bloco operatório; C – corredor; L – zona limpa; S – zona suja; E – zona esterilizada. A vermelho os isolados seleccionados para sequenciação.

Depois da análise do dendrograma, seleccionaram-se os representantes (a vermelho) de cada grupo que foram identificados por sequenciação da região ITS.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências do GenBank, permitindo obter similaridade das mesmas com sequências depositadas na base de dados e identificar os isolados ao nível da espécie ou género.

Assim, podemos atribuir uma identificação aos nossos isolados com base na sequência (Tabela 5).

Tabela 2 – Identificação dos fungos isolados através da base de dados.

Espécie isolados			
Espécie / Género	Isolados nº	GenBank	Classe
<i>Alternaria</i> sp.	2,3	AY168773.1	Euascomycetes
<i>Aspergillus</i> sp.	E10	AM883165.1	Euascomycetes
<i>Aureobasidium pullulans</i>	48; 69	GQ376094.1	Dothideomycete
<i>Botrytis</i> sp.	35; E2;E8	EF821471.1	Leotiomycetes
<i>Botryotinia fuckeliana</i> / <i>Sclerotinia sclerotium</i>	E3	EF207415.1	Leotiomycetes
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	11; 41; 60; 71; 79	FJ537128.1	Dothideomycetes
<i>Davidiella tassiana</i>	59; 62	EU167591.1	Dothideomycete
<i>Cladosporium</i> sp.			
<i>Cladosporium</i> sp.	74;80; E6	FJ379801.1	Dothideomycete
<i>Cordyceps bassiana</i> (<i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>)	23; 25; 66; 40;	GQ354257.1	Euascomycetes
<i>Epicoccum nigrum</i>	E9	DQ981396.1	
Nectriaceae (<i>Fusarium</i> sp.)	9; 28;45;	EF060504.1	Sordariomycetes
Nectriaceae sp.	34	EF121865.1	Sordariomycetes
<i>Pichia</i> sp.	E11	EI621563.1	Hemiascomycetes
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	12	FJ515212.1	Uradimiomycetes
<i>Penicilium</i> sp.	13; 16; 20; 26;38;E7;	DQ981398	Euascomycetes
<i>Mycosphaerella</i> sp.	65	EF619925.1	
Não identificado	E12	DQ681344.1	Ascomycete

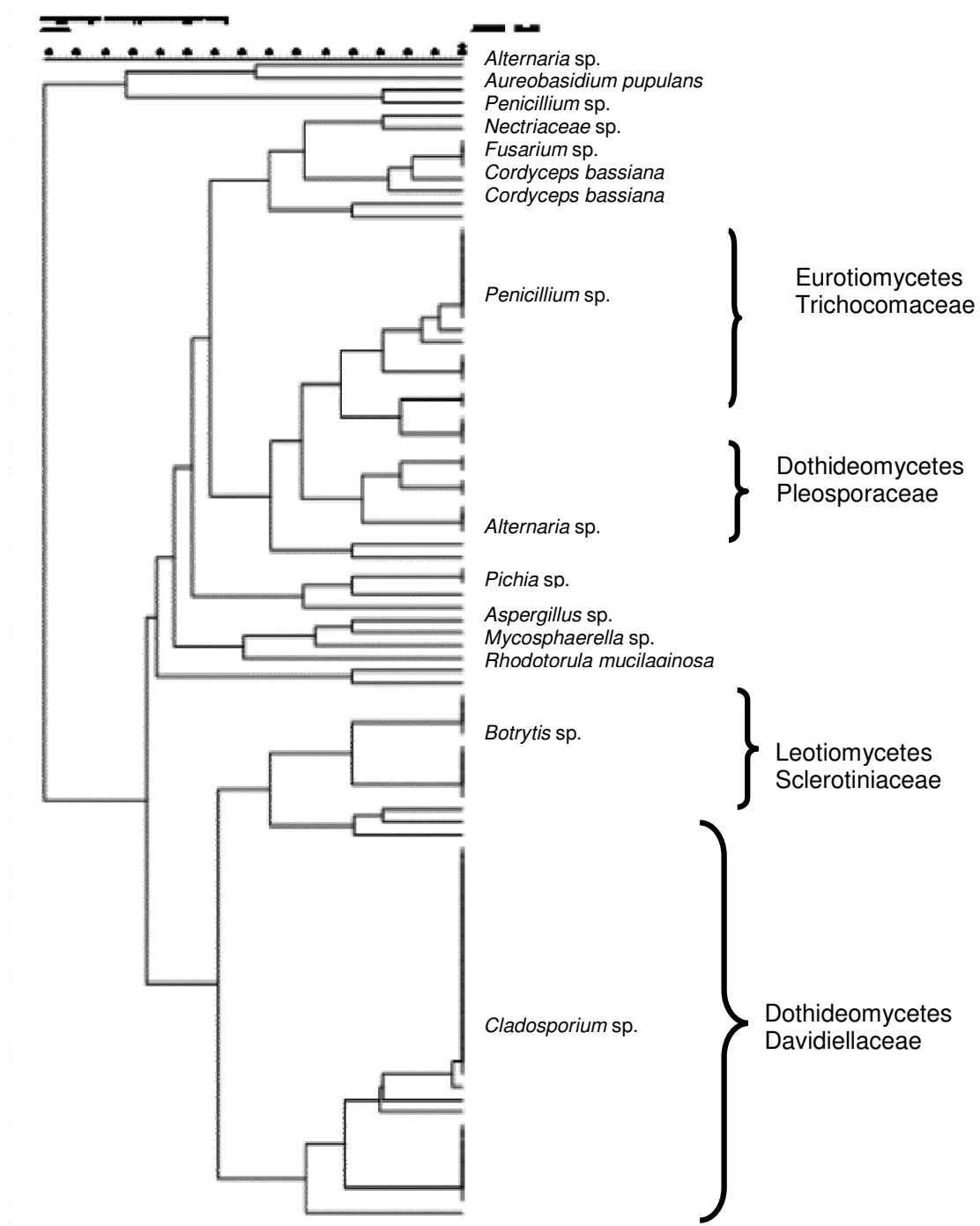


Figura 12 – Análise dos perfis ARDRA utilizando o coeficiente de similaridade Dice (Opt: 4,35%) (Tol: 1,3%).

3.5.Resultado da análise da base de dados GenBank

3.5.1. Espécie/Género de fungos no Hospital A

Tabela 3 – Quantidade de fungos isolados por espécie no BO do Hospital A

Hospital A	BO
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
<i>Penicillium</i> sp.	5
<i>Cordyceps bassiana</i> (<i>Beauveria bassiana</i>)	2
<i>Botrytis</i> sp.	4
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1
<i>Cladosporium</i> sp.	9

Tabela 4 – Quantidade de fungos isolados por espécie no SCE do Hospital A

Hospital A	L	S	C	E
<i>Alternaria infectoria</i>			3	5
<i>Penicillium</i> sp.	2	3	1	8
<i>Cordyceps bassiana</i> (<i>Beauveria bassiana</i>)	1			
<i>Nectriaceae</i> (<i>Fusarium</i> sp.)			5	
<i>Nectriaceae</i> (não identificada)			1	
<i>Botrytis</i> sp.			3	2
<i>Cladosporium</i> sp.	7	8	5	6
<i>Mycosphaerella</i> sp.	1			

No bloco operatório, na zona estéril e na zona limpa do Hospital A verificou-se que as percentagens dos géneros *Cladosporium* e *Penicillium* nos locais de colheita são semelhantes (Figura 12). No entanto estes locais são esterilizados pelo que deveria haver uma menor quantidade do género *Cladosporium* e *Penicillium*.

No corredor e na zona esterilizada, verificou-se uma menor percentagem de *Cladosporium* em relação à zona suja, mas uma maior diversidade de espécies (Figura 13).

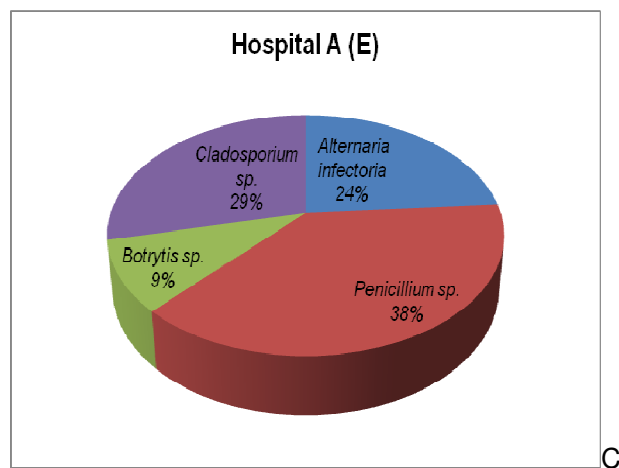
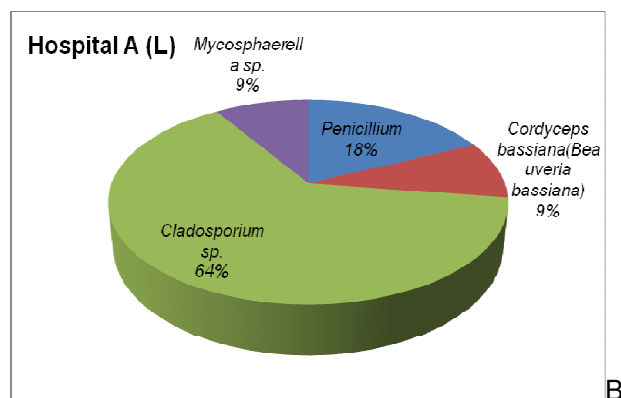
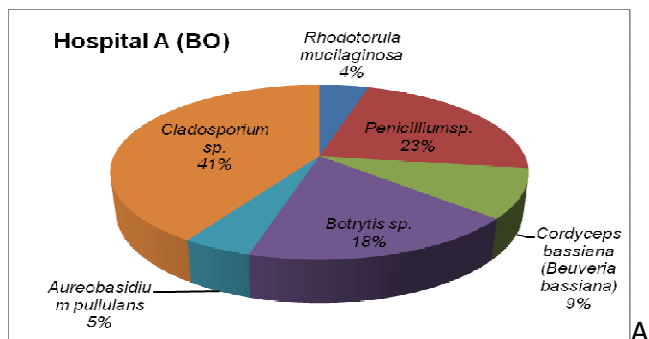


Figura 13 - Representação da distribuição, em percentagem do gênero fúngico no hospital A. Em que: A - Bloco operatório; B- Zona Limpa e C - Zona Esterilizada.

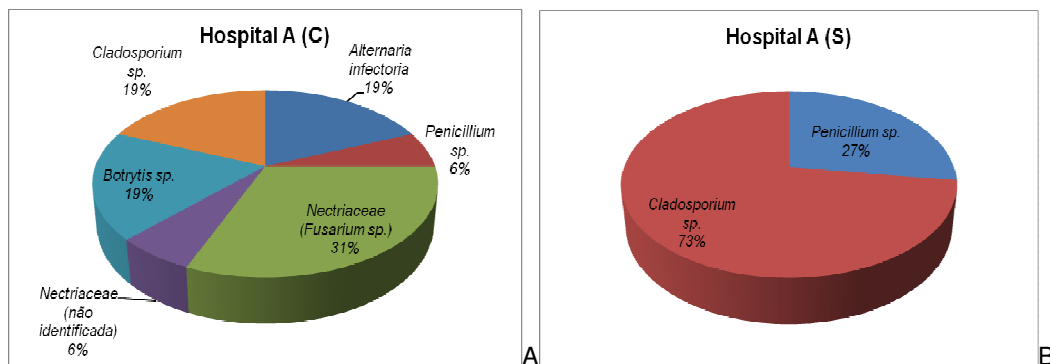


Figura 14 – Representação da distribuição dos fungos da Zona suja e da Zona de referência. A – corredor; B – zona suja2

Na zona suja (Figura 14-B) do serviço de esterilização onde se efectua a descontaminação do Hospital A verificou-se um predomínio do género *Cladosporium* 73%. Como tal, trata-se de um elemento de informação importante que poderá constituir-se em factor determinante para o correcto diagnóstico de eventuais futuras infecções nosocomiais ocorridas naquele hospital. A maioria das espécies do género *Cladosporium* tem sido relatada como patogénico e algumas espécies têm sido observadas como responsáveis primários por quadros de feo-hifomicoses superficiais (onicomicoses, queratites), cromomicoses e feo-hifomicoses profundas (meningites, quadros pulmonares).

Os fungos mais abundantes no Hospital A (Tabela 5 e 6) foram: *Cladosporium* (Dothideomycetes, Davidiellaceae) com 42% de representação, *Nectriaceae* (Ascomycetes) com 7%, *Penicillium* sp. (Eurotiomycetes, Trichocomaceae) com 23%, *Alternaria* (Dothideomycetes, Pleosporaceae) com 10%, *Botrytis* sp. (*Sclerotinia* sp.) com 11%, *Rhodotorula mucilaginosa* com 1% e outras espécies com 6% (Figura 14).

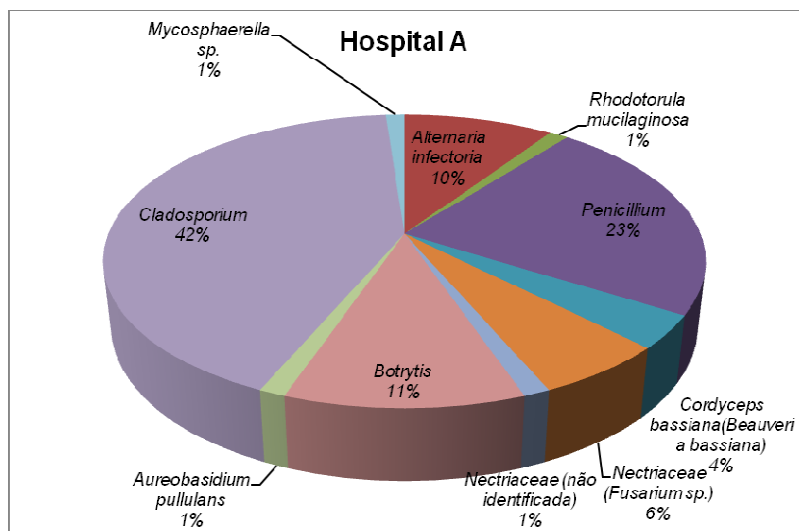


Figura 15 – Representação da distribuição em percentagem do género/espécie fúngico no Hospital A

3.5.2. Identificação dos fungos do Hospital B

Tabela 5 – Quantidade de fungos isolados por género/espécie no BO do Hospital B.

Hospital B	BO
<i>Aspergillus</i> sp.	1
<i>Botrytis</i> sp. / <i>Botryotinia</i> sp.	2
<i>Botryotinia fuckeliana</i> / <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1
<i>Cladosporium</i> sp.	2
<i>Epicoccum nigrum</i>	1
<i>Penicillium</i> sp.	1
<i>Pichia</i> sp.	2
Ascomycete não identificado	2

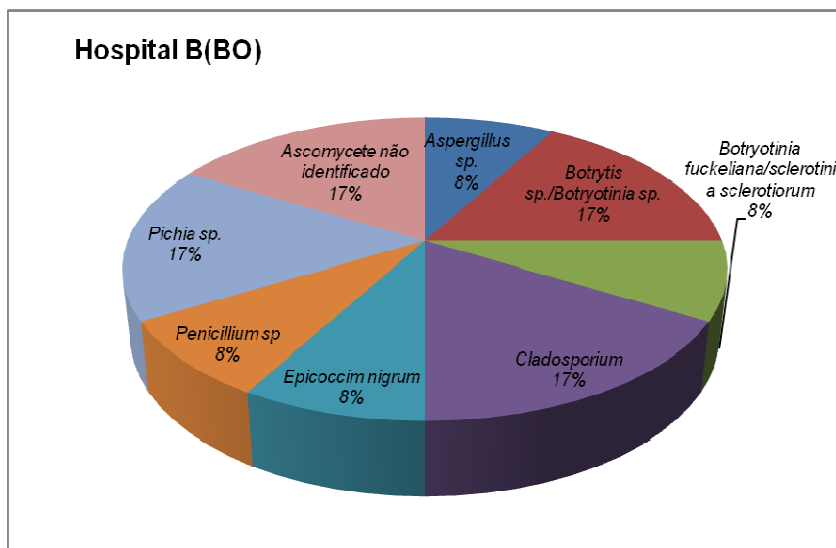


Figura 16 – Representação da distribuição em percentagens do género/espécie fúngico do bloco operatório do Hospital B.

Os fungos mais abundantes no BO do Hospital B (Tabela 8 e Figura 16) foram: *Cladosporium* (Dothideomycete) com 17% de representação, *Pichia* sp. (Saccharomycetes) com 8%, *Penicillium* (Eurotiomycetes) com 8%, *Botrytis* sp. (*Sclerotinia* sp.) com 17%, *Aspergillus* sp. com 8% e outras espécies com 42%.

3.5.3.Comparação dos resultados obtidos do Hospital A e do Hospital B no Bloco Operatório

Pela análise dos resultados em estudo, pode aferir-se que na sala do Bloco Operatório dos dois hospitais, a quantidade de género de fungos identificados está de acordo com os trabalhos de outros autores (Landrin 2005, Green et al. 2006, Kasprzyk 2008), tendo-se obtido contagens entre os 0 a 38 UFC/m³. Ortiz et al. (2009) refere que os níveis de amostra de 5 UFC/m³ de fungos são satisfatórios no teatro operatório de risco elevado (Figura 16).

No presente estudo, o número de fungos em UFC/m³ obtidos nos dois hospitais encontra-se dentro dos limites estabelecidos pela lei portuguesa em vigor (Dec. Lei 79/2006, de 4 de Abril).

Num estudo referente à concentração de fungos na atmosfera de Portugal, na cidade do Porto, verificou-se que os picos mais elevados ocorreram nos meses de Janeiro, Abril e Agosto, sendo o género mais frequente *Cladosporium*, e a espécie

Cladosporium cladosporioides (Nunes 2008). Em diferentes países da Europa cerca de 60 a 80% dos fungos encontrados no exterior são *Cladosporium*, 2 a 20% *Alternaria*, 2 a 15% *Botrytis*, 2 a 15% *Penicillium* e *Aspergillus* (Nunes 2008).

Segundo (Singh et al. 1994, Meriggi et al. 1996) os géneros com maior percentagem de ocorrência no Bloco Operatório são os seguintes: *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp, com um maior pico nos meses de Julho e Agosto, havendo uma diminuição destes valores nos restantes meses. Nos dois hospitais, os fungos isolados mais comuns de acordo com os resultados desse estudo foram *Cladosporium*, *Penicillium* e *Botrytis*. Assim, os valores registados no estudo efectuado nos dois hospitais estão de acordo com estes autores.

Por outro lado, pode-se afirmar que o número de cirurgias não influencia a quantidade do número de fungos detectada. Verificou-se que nos dias relativos às colheitas A7 e B4 (Figura17), foram realizadas várias cirurgias, tendo-se obtido valores baixos de UFC/m³, mesmo quando comparativamente a outras colheitas.

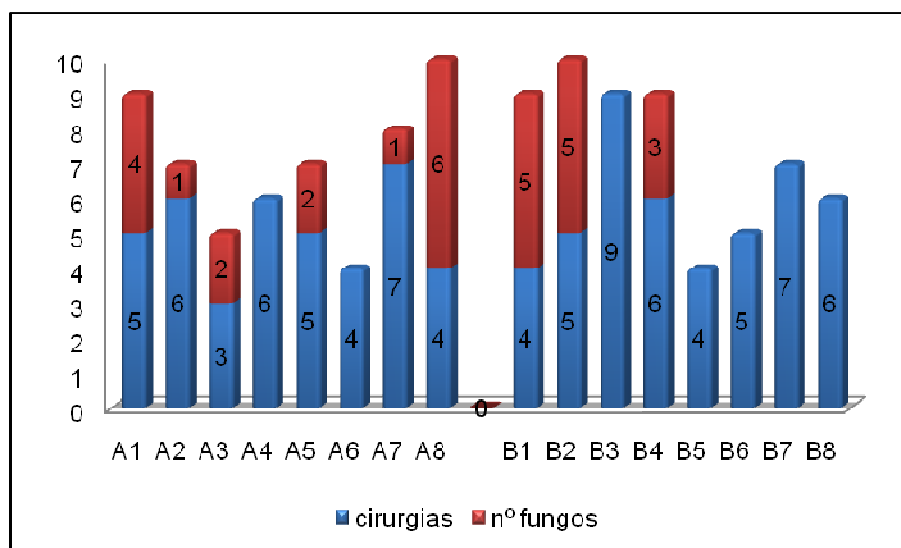


Figura 17 – Representação da distribuição do número de cirurgias e quantidade de fungos isolados (UFC/m³) no bloco operatório dos Hospitais: sendo o A – Hospital A e B - Hospital B (Santos 2008, Silva 2008).

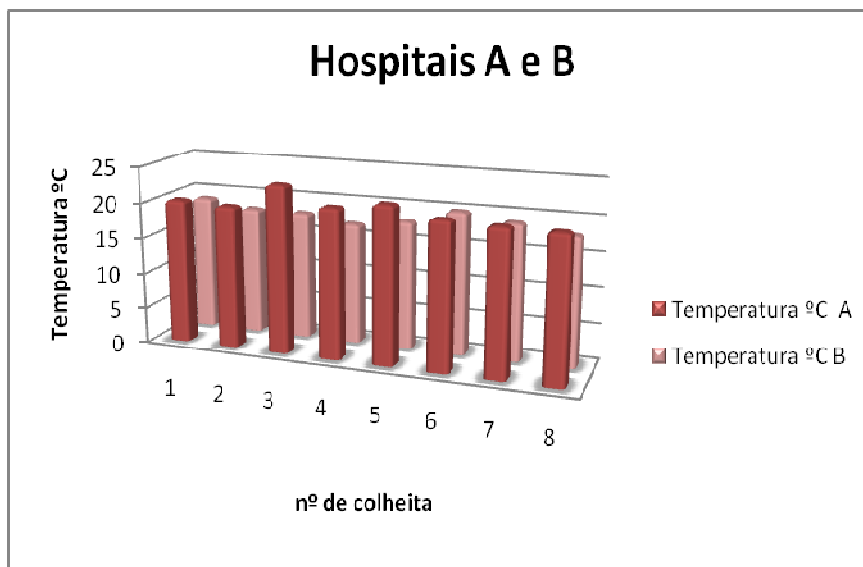


Figura 18- Representação da distribuição da temperatura °C de cada colheita no BO nos dois hospitais (Santos 2008, Silva 2008)).

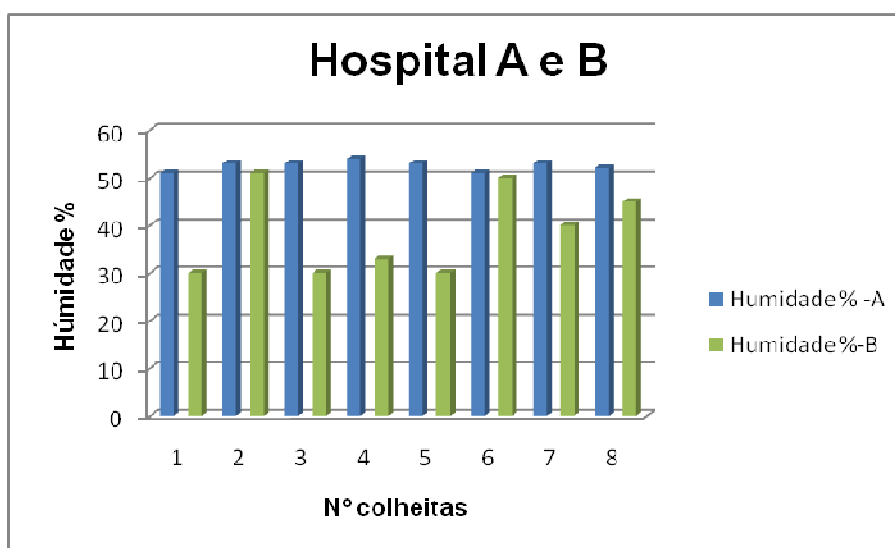


Figura 19 – Representação da distribuição da humidade em percentagem em cada colheita nos dois hospitais (Santos 2008, Silva 2008).

Os resultados dos dois hospitais sugerem que o sistema AVAC, os filtros HEPA, o sistema de limpeza e a organização dos espaços (anexo 1 e 2), a temperatura e a humidade (anexo 9) proporcionam uma boa qualidade do ar interior nestes locais.

Os fungos são sensíveis ao frio e crescem em habitats húmidos e escuros. Os factores mais importantes para o seu crescimento são a humidade e a temperatura (Nunes et al. 2008). Pode-se concluir que a temperatura abaixo de 20°C e a humidade relativa acima dos 30%, influencia significativamente a propagação dos fungos (Figura 18 e 19). Já relativamente aos fungos mesófilos as condições ideais de desenvolvimento nestes dois hospitais ocorram para temperaturas entre 19°C a 25°C (Figura 20).

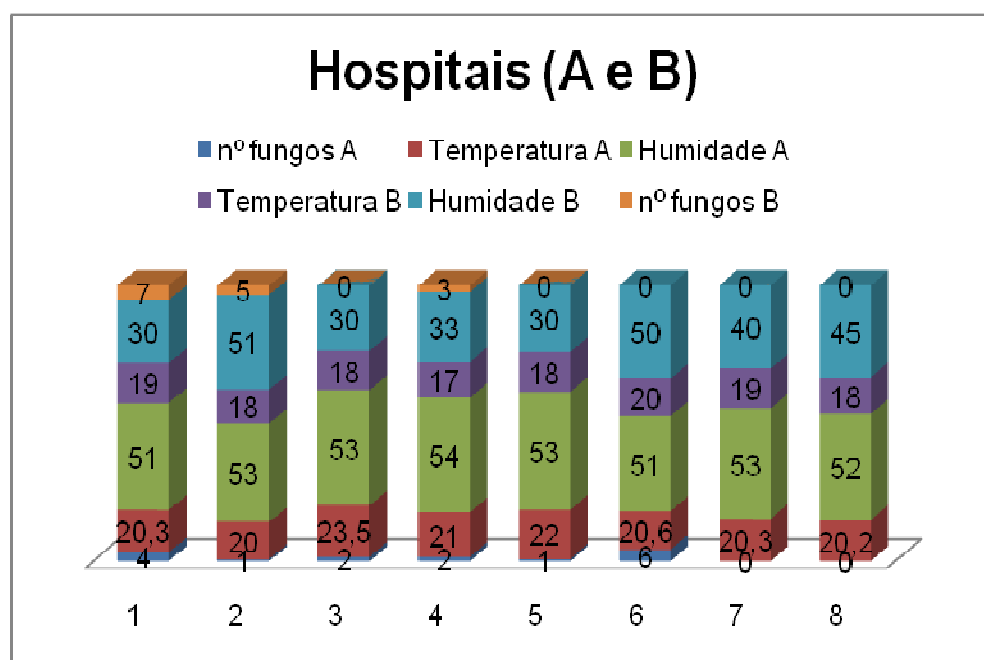


Figura 20 - Representação da relação da distribuição da quantidade de fungos, temperatura e humidade por colheita nos dois hospitais (Santos 2008, Silva 2008).

No Hospital A ocorrem fungos contaminantes oportunistas como *Aureobasidium pullulans*, de propagação aérea, e a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* (levedura) com uma distribuição terrestre e marinha, que provoca endocardites, meningites, peritonites e infecções derivadas do uso de cateteres (Savini et al. 2008). Igualmente foram encontrados fungos patogénicos oportunistas ligados a infecções nosocomiais, aparecem os géneros *Fusarium* e *Penicillium* (Piteira 2007). No Hospital B apresentam-se, em particular, os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* que estão sobretudo envolvidos na génese da asma e alveolites alérgicas, bem como o género *Pichia*.

Aspergillus sp. é causador da aspergilose, que se encontra associado a poeiras ou condições de humidade ambiental em instalações hospitalares. Este fungo coloniza a região após a infecção bacteriana ter destruído a superfície. São infecções destrutivas e só o tratamento precoce é eficaz (otomicoses e infecções oftálmicas) (Cruickshank and Swain 1973).

(Ortiz et al. 2009) sugere que as contagens de *Aspergillus* devam ser inferiores a 5 CFU/m³ no ar com filtros HEPA. Nesta base o resultado no hospital B está de acordo com o recomendado, no hospital A não ocorreu esta espécie.

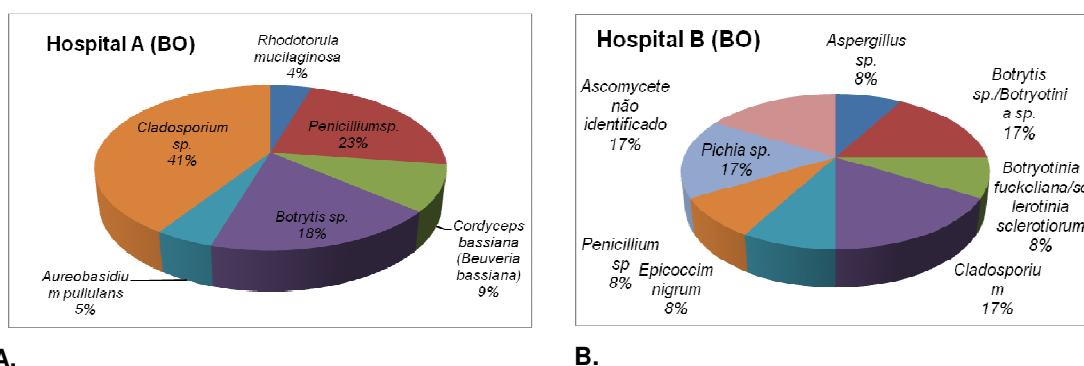


Figura 21 – Representação do resultado das colheitas em percentagem do género fúngico no Bloco operatório dos dois hospitais.
A – Hospital A; B – Hospital B.

Os fungos considerados como contaminantes, de pouca importância clínica, são hoje examinados como causadores de enfermidades disseminadas. São agentes possíveis de quadros infecciosos severos em doentes imunodeprimidos. Nos hospitais ocorreram alguns géneros, onde são descritos e localizados:

Epicoecium nigrum é uma espécie hidrofílica existente na água, solo e superfícies, e em indivíduos em que o sistema imunitário esteja deficiente, esta espécie poderá levar a uma possível infecção do trato respiratório causando insuficiência respiratória, está como já foi referida na génese da asma, foi encontrada no BO do hospital B..

Beuveria bassiana é uma espécie patogénica de insectos e de outros animais, e também agente oportunista de infecções dos seres humanos, afectando, principalmente indivíduos imunodeprimidos e também está associada a pneumonias e queratites. Esta espécie foi encontrada no bloco operatório e na zona limpa do hospital A.

Botrytis sp. é um contaminante de plantas, havendo alguns registos de infecções em animais e humanos (Kuhn et al. 2003), foi colectada no bloco operatório nos dois hospitais.

Os fungos que poderão causar infecções nosocomiais são:

Cladosporium sp. a grande maioria das espécies do género *Cladosporium* tem sido relatada apenas como contaminante. Entretanto, algumas espécies desse género têm sido observadas como responsáveis primárias por quadros de feo-hifomicoses superficiais (onicomicoses, queratites etc.), cromomicoses e feo-hifomicoses profundas (meningites, quadros pulmonares etc.) (Sidim and Moreira 1999), esta espécie de fungo foi encontrada nos dois hospitais em todo o Serviço do Bloco Operatório.

Penicillium sp. - Apresenta ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrado sobre todos os tipos de substrato. É, provavelmente, o género contaminante, por via aérea, mais frequentemente isolado em laboratórios de micologia, podendo alcançar elevadas concentrações atmosféricas dos seus esporos dependendo da região geográfica. Produz esporos que ao serem inalados invadem órgãos internos e causam lesões disseminadas (Sedrim and Moreira 1999). Foi encontrado nos dois hospitais em todas as salas estudadas Clinicamente estão envolvidas em casos de queratites, otites, sinusites, infecções urinárias, infecções pulmonares, quadros alérgicos, micotoxicoses e diversos quadros de hialo-hifomicoses. Actualmente uma espécie, *P. marneffe*, tem sido implicada em quadros severos de infecções sistémicas em pacientes com HIV (Sidim and Moreira 1999).

Aspergillus sp. – Conhecem-se cerca de 100 espécies. Coloniza a região após infecção bacteriana ter destruído a superfície. São infecções destrutivas e só o tratamento precoce é eficaz (otomicoses e infecções oftálmicas) (Cruickshank and Swain 1973). A mortalidade da aspergilose invasiva não tratada é de 100%, e a mortalidade em indivíduos tratados é muito alta. O pulmão não é a única porta de entrada de *Aspergillus fumigatus*. Assim, a infecção pode ocorrer também por via cutânea onde uma pequena ferida poderá ser uma porta de entrada de infecção (Augustowska et al. 2006). Surgiu no bloco operatório do hospital B.

Alternaria sp. encontrada no hospital A no corredor e zona estéril, está relacionada com diversos quadros de feo-hifomicoses (Sidim and Moreira 1999; Cruickshank and Swain 1973). A alternariose tem envolvimento cutâneo, podendo ser um problema grave sobretudo em doentes terminais com SIDA e imunodeprimidos podendo haver na maioria dos casos manifestações de infecções invasivas sistémicas.

O género ***Candida*** é sem dúvida o mais abundante no ambiente hospitalar mas, existem outras leveduras no ambiente hospitalar, tanto no ar e na água, como na pele e no tracto gastrointestinal de doentes e funcionários, que podem causar quadros infecciosos. Em ambos os hospitais verificou-se a ocorrência de leveduras. No hospital A no BO verificou-se *Rhodotorula mucillaginosa* enquanto que no Hospital B verificou-se a ocorrência de *Pichia* sp. (*Hansenula* sp.) Estas leveduras podem causar infecções em mulheres provocando vulvovaginites, podendo estar associadas a modificações da concentração de progesterona, estradiol e glicogénio, e à variação de pH vaginal. Nas grávidas podem causar infecções a nível da placenta e feto resultando em aborto tardio do 2º trimestre (Kalousek and Neave 1990). A idade, a diabetes, a imunossupressão terapêutica, o uso de medicamentos (por exemplo, antibióticos de largo espectro, anticoncepcionais orais, quimioterapia citotóxica), a ventilação mecânica e a broncoscopia, são factores de agravamento do risco de contaminação dado o manuseamento de produtos com as mãos (Silva et al. 2003, Savini et al. 2008). Nesse sentido, uma correcta higiene será a primeira linha de prevenção.

Para combater as infecções são usados fármacos de uma forma intensiva como, por exemplo, os antimicrobianos e antifúngicos, numa tentativa de “esterilizar” os doentes, causando diversos problemas de desequilíbrio nos padrões normais dos seus ecossistemas, alterando os factores de antibiose que os regulam. Isto é, a partir do momento em que as bactérias desaparecem, o desequilíbrio surge por alteração do ecossistema, havendo condições ideais para possível proliferação de fungos. Este desequilíbrio pode permitir que os fungos proliferem se tiverem condições para tal, nomeadamente por falta de higiene e segurança.

Efectivamente, as condições de higiene e segurança hospitalares dos doentes são de extrema importância para evitar que os possíveis agentes provenientes da atmosfera possam proliferar, colonizando e infectando os pacientes. Assim, as manobras físicas bem como as farmacológicas/terapêuticas, podem ser um factor crítico para a resistência à terapêutica e ao desenvolvimento da propagação dos microrganismos e ao aumento das infecções nosocomiais (Hsueh 2002, Guarro 2002).

4. CONCLUSÃO

São cada vez mais frequentes estudos de contaminação em ambientes hospitalares e da sua relação com os estudos epidemiológicos e morbilidade/mortalidade em doentes imunodeprimidos (Merieg et al. 1996, Nessa et al. 2001).

A infecção hospitalar adquirida no bloco operatório após uma cirurgia aumenta o período médio de internamento, as complicações que daí advêm e, conseqüentemente, os custos da actividade dos hospitais envolvidos.

O grau de contaminação por fungos num ambiente hospitalar pode aumentar dramaticamente pela combinação de vários factores tais como um micro clima favorável (temperatura, humidade), manobras de higiene mal executadas, sistemas de ventilação sem manutenção e densidade populacional elevada. Uma vez que a exposição a fungos pode causar sérios problemas de saúde é essencial que nas situações de risco envolvendo, designadamente, pacientes submetidos a cirurgias, doentes em cuidados intensivos, imunodeprimidos e, ainda, idosos em que o seu estado imunológico, a sua condição física e a normal homeostase está deficiente, exista uma correcta avaliação dos graus de contaminação nos diversos ambientes. Assim, uma das preocupações fundamentais será a necessidade de garantir a existência de uma boa política de Higiene e de Segurança Ambiental.

A identificação dos fungos isolados pode ser uma tarefa difícil, baseada exclusivamente em caracteres morfológicos e culturais. Nesse aspecto, a aplicação de métodos moleculares, em particular técnicas baseadas em PCR, pode representar uma grande ajuda.

A eficácia da utilização de sistema de alta eficiência de filtração do ar (HEPA) em pacientes submetidos a cirurgias, imunodeprimidos ou transplantados, tem sido uma mais-valia para o controlo da propagação dos microrganismos.

Este trabalho revelou existirem fungos em valores inferiores aos limites legais nos hospitais avaliados mas, mesmo assim, podendo causar infecções, pelo que seria necessário rever os limites máximos admissíveis (500 CFU/m³) referidos no Decreto-Lei nº79/2006, de 4 de Abril.

A qualidade microbiológica do ar no ambiente hospitalar depende de vários factores, sendo a temperatura, a humidade e os sistemas de ar condicionado, ventilação e aquecimento, parâmetros comuns aos dois hospitais estudados. A temperatura do Hospital A varia entre 20°C-23°C, e a humidade relativa varia entre 30-51%. No Hospital B a temperatura varia entre os 17°C-20°C e a humidade relativa entre 51-54%.

Outro factor determinante poderá ser a região geográfica (humidade; temperatura), estando o Hospital A localizado no interior de Portugal enquanto o Hospital B se localiza na zona Centro.

Pode inferir-se que a quantidade e a movimentação de pessoas no local sejam factores determinantes para uma maior contaminação desses ambientes, ao analisar a contaminação ambiental em cinco áreas de trabalho de ambientes considerados assépticos, antes das manobras de higiene. No Hospital A as manobras de roupa suja são executadas em local próprio, no Hospital B estas são realizadas no corredor, uma área de passagem, o que facilita a propagação de microrganismos.

Neste estudo foi identificado no hospital B o isolado *Aspergillus* que poderá estar envolvido em infecções nosocomiais e cuja presença poderá eventualmente estar relacionada com o sistema de ventilação, filtros de ar, exaustores e movimentação das pessoas em unidades críticas.

Nos dois hospitais estudados as espécies comuns e em maior percentagem no BO são *Cladosporium*, *Penicillium*, *Botrytis*. No Hospital A *Cladosporium* (Dothideomycetes) com 41%, *Penicillium* (Eurotiomycetes) com 23% e *Botrytis* (*Sclerotinia*) com 15%. Já no Hospital B as percentagens são de 17% *Cladosporium*, 17%, *Penicillium* e 8% *Botrytis*.

Os resultados obtidos servirão de suporte para monitorizar a limpeza dos locais e aparelhos de ar condicionado e controlar a contaminação ambiental, analisando vários serviços com a preocupação de identificar os fungos existentes e os doentes mais afectados, bem como as especialidades clínicas onde existem doentes de risco.

Neste trabalho realça-se que o estudo dos fungos é um instrumento útil para o aumento do conhecimento dos agentes patogénicos e das capacidades para o tratamento e prevenção das infecções que provocam, nomeadamente, infecções nosocomiais.

Neste cenário, é crucial que o pessoal técnico seja treinado para adoptar um comportamento de higiene apropriado e a actividade em ambientes não protegidos seja tão baixa quanto possível.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Foram realizados estudos independentes em Hospitais localizados em regiões distintas para avaliação e caracterização dos microrganismos no bloco operatório. Como tal, outros estudos de comparação poderão ser realizados nos diferentes hospitais com a preocupação de verificar se existem diferenças e variações dos microrganismos devido à localização geográfica.

Seria importante, realizar estudos periódicos em serviços de risco como a Pneumologia, Unidade de Cuidados Intensivos, Serviço de Anatomia Patológica, Patologia Clínica e outros.

Importa, finalizando, sensibilizar outros Hospitais para efectuarem controlo dos ambientes de risco monitorizando periodicamente a qualidade do ar, permitindo identificar e vigiar possíveis surtos de infecções nosocomiais, contribuindo assim para um melhor qualidade dos serviços tanto para os utentes como para os prestadores de serviços de Saúde.

6. BIBLIOGRAFIA

Augustowska M, Dutkiewicz J. 2006. Variability microflora in a hospital ward within a period of one year. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13:99-106

Araujo R, BSC, Cabral PJ, PhD, Rodrigues GA. 2008. Air filtration systems and restrictive access conditions improve indoor air quality in clinical units: *Penicillium* as a general indicator of hospital indoor fungal levels. *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*, inc 129 - 134.

Cooper GM. 2005. A célula. Uma abordagem molecular. Artmed ed. São Paulo p.188-197.

Cruickshank R, Duguid P, Marmion B, Swain C. 1973. *Microbiologia Médica*. Fundação Caloust Gulbenkian. 4nd ed. Lisboa p.1018 - 1170.

CTIN. 2002. Direction Generale de la Santé. Direction de l'Hospitalisation et l'Organization des Soins. Comite Technique National des Infections Nosocomiales. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé. Air, Eaux et Surfaces.

Decreto-Lei 79/2006, Diário da República I serie - A, Nº 67 – 4 de Abril de 2006, p. 2416 – 2468.

Denning DW, O'Driscoll BR, Hogaboam CM, Bowyer P, Niver R. 2006. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Journal of European Respiratory* 27:615-626.

Dharan S, Pittet D. 2002. Environmental controls in operating theatres. *Journal of Hospital Infection* 51:79-84.

Dupont J, Denetiere B, Jacquet C, Roquebert MF. 2006. PCR-RFLP of ITS rDNA the rapid identification of *Penicillium* subgenus *Biverticillium* species. *Revista Iberoamericana de Micologia* 23:145-150.

Fell WR. 1997. Rapid identification of yeast species using three primers in a PCR. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 12(2):174-180.

Ferreira W and Sousa J. 2000. Microbiologia. In: Freitas G, editor. Micologia Geral. Lidel ed. técnica Lisboa. p.292-305.

Gomes JFP. 2002. Contaminação do ar interior por bioaerossóis. Revisão portuguesa de pneumologia VIII(6):689-694.

Green JB, Tovery E, Sercomb J, Blachere MF, Beezhold HD, Schmechel D. 2006. Airborne fungal fragments and allergenicity medical mycology. Medical Mycology Taylor e Francis Group 44:5245-5255.

Godish DR, Godish TJ. 2007. Relation between sampling duration and culturable airborne mould and bacteria on selected culture media. Journal of Applied Microbiology 102:1479-1484.

Górny LR. 2004. Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air-a review. Annals of Agricultural Environmental Medicine 11:185-197.

Guarro J, Kallas EG, Godoy P, Karenina A, Gené J, Stchigel A, Colombo AL. 2002. Cerebral Aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. Emerging Infectious Diseases 8(9):989-991.

Hsueh PR, Chen ML, Sun CC, Chen WH, Pan HJ, Yang LS, Chang SC, Ho SW, Lee CY, Hsieh WC, Luh KT. 2002. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing Nosocomial infections at a university hospital in Taiwan, 1981 - 1999. Emerging Infectious Diseases 8(1):63-68.

Jones AM., Harrison RM. 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - a review. Science of the Total Environment 326:151-180.

Kalousek DK, Neave C.1990. Pathology of abortion, the embryo and the previable fetus. In: Wigglesworth JS, Singer DB. Textbook of fetal and perinatal pathology. New York: Blackwell Scientific Publication p.151-152.

Kocot KJ, Lis OD, DarmolB, Chleboweczyk GU, Woś H, Górny LR. 2007. Children`s allergic diseases and microbial contamination of indoor air-a case report. Annals of Agricultural and Environmental 14:187-190.

Kasprzyk I. 2008. Aeromycology-main research fields of interest during the last 25 years. *Annals of Agricultural Environmental Medicine* 15:1-7.

Kuhn DM, Ghannoum MA. 2003. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infections disease perspective. *Journal of Clinical Microbiology* 16(1):144 – 172.

Landrin A, Bissery A, Kac G. 2005. Monitoring air sampling in operating theatres: can particle counting replace microbiological sampling? *Journal of Hospital Infection* 61:27-29.

Lobato R, Danielsk J, Silveira E. 2007. Pesquisa de fungos anemófilos em biotério. *Vittale, Rio Grande* 19(1):9-16.

McPherson MJ and Møller GS. 2006. PCR second edition. *Genome analysis*. 2nd ed. New York, NY 10016. Taylor and Francis p.259-261.

Meriggi A, Ricci Stefano, Bruni M, Corsico R. 1996. Aerobiological monitoring for fungal spores in a rehabilitation hospital in northern Italy. *International Journal of Aerobiology* 12:233-237.

Moller E, Behnweg G, Sandermann H, Geiger H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi; fruiting bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids research* 20:6115-6116.

Moranskal L. 2006. Droplet fate in indoor environments, or can we prevent the spread of infection? *Indoor Air* 16:335-347.

Nesa D, Iortholary J, Bouakline A, Bordest M, Chandenier J, Derouin F, Gangneux JP. 2001. Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination. *Journal of Hospital Infection* 47:149-155.

Nunes C, Câmara I, Ferreira M, Almeida M. 2008. Fungos na atmosfera de Portugal. *Revista Portuguesa de Imunologia* 16(4):337-394.

Nunes GZ, Mertins SA, Altoe LA, Nishikawa MM, Leite OM, Aguiar P, Fracalanza ES. 2005. Indoor air microbiological evaluation of offices, hospitals, industries, and shopping centers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100(4):351-357.

Oliveira M, Ribeiro H, Abreu I. 2005. Annual variation of fungal spores in a atmosphere of Porto: 2003. *Annals of Agricultural Environmental Medicine* 12:309-315.

Ortiz G, Yagüe G, Segovia M, Catalán V. 2009. A study of air microbe levels in different areas of a hospital. *Current Microbiology* 59:53-58.

Piteira C. 2007. *A Qualidade do Ar Interior em Instalações Hospitalares*. Lidel. 1st ed, p. 63-65.

Prewitt, ML, SU, Diehl, TC, McElroy, Diehl WJ. 2008. comparison of general fungal and basidiomycete – specific ITS primer for identification of wood decay fungi. *Journal of Forest Products* 58(4):66-71.

Perdelli F, Sartini MLC, Spagnolo AM, Dallera M, Ottria G, Grimaldi ML, Orlando P. 2006. Fungal contamination in hospital environments. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 27:44-47.

Pittet D, MD, MS, Allergranzi B, MD, Boyce J, MD, . 2009. The world health organization guidelines on hand hygiene in health care and their consensus recommendations. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 30(7):611-622.

Hsueh H, Chen M, Sun C, Chen H, Pan H, Yang L, Chang S, Ho S, Lee C, Hsieh W, Luh K. 2002. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan 1981-1999. *Emerging Infectious Diseases* 8(1):63-68.

Raton T. 2004. Molecular identification methods of yeasts of biotechnological interest. *Revista iberoamericana de micologia* 21:15-19.

Redd C S, MD. 2002. State of the science on molds and human health. Centers for disease control and prevention, U.S. Department of Health and Human Services [cited 2009 September 8]. Available from: <http://www.cdc.gov/niosh/hhe/reports>.

Santilli J, Rockell MDW. 2003. Fungal contamination of elementary schools: a new environmental hazard. *Annals of Allergy Asthma Immunology* 90:203-208.

Santos ACM. 2008. Microbiologia do ar: monitorização do ar em ambiente hospitalar [dissertação]. Universidade de Aveiro p.25-29.

Santos Joana (SJ) [Internet].[update 2009 Agosto 8] Consultoria e engenharia higiene e segurança no trabalho. Available from: <http://www.hseg.pt/serviços/hst.html>.

Savini V, Sozio F, Catavittello C, Talia M, Manna A, Febbo F, Balbinot A, Bonaventura DG, Piccollomini R, Parruti G, D'Antonio D. 2008. Femoral prosthesis infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 46(10):3544-3545.

Sartori Amalia. 2009. Proposta de recomendação do conselho relativa à segurança dos doentes, incluindo a prevenção e o controlo de infeções associados aos cuidados de saúde (COM (2008) 0837-C6-0032/3009 (CNS)). Comissão do ambiente, de saúde pública e de segurança alimentar. Relatório. Parlamento Europeu.

http://www.europa.europa.eu_sides_get Doc.pdf

Sidrim J and Moreira J. 1999. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Guanabara Koogan editora. Sidrim JJC, Paixão GC, Rocha. Fungos contaminantes mais frequentes em micologia médica 20: 229.

Silva E. 2008. Avaliação microbiana do ar em ambiente hospitalar. [dissertação]. Universidade de Aveiro p.18-25.

Silva V, Zaped G, Ryback ME, Febrén. 2003. Yeast carriage on the hands of medicine students. *Revista iberoamericana de micologia* 20(2):41-45.

Singh A, Sharad V, Singh BA. 1994. Airborne fungi in the hospitals of metropolitan Delhi. *Aerobiologia* 10:11-12.

Strachan T and Read AP. 2000. Human molecular genetics. PCR. In: sequenciamento de DNA e mutagênese in vitro.. Versão Portuguesa. Dioscientifica. Publisher Lda Reino Unido p.124.

Stetzenbach L, Buttner M, Crus P. 2004. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology* 15:170-174.

Trabululsi A. 2001. *Microbiologia*. 2nd ed. Atheneu. São Paulo.

Vanhee MEL, Nelis JH, Coenye T. 2008. Enumeration of airborne bacteria and fungi using solid phase cytometry. *Journal of Microbiological Methods* 12-19.

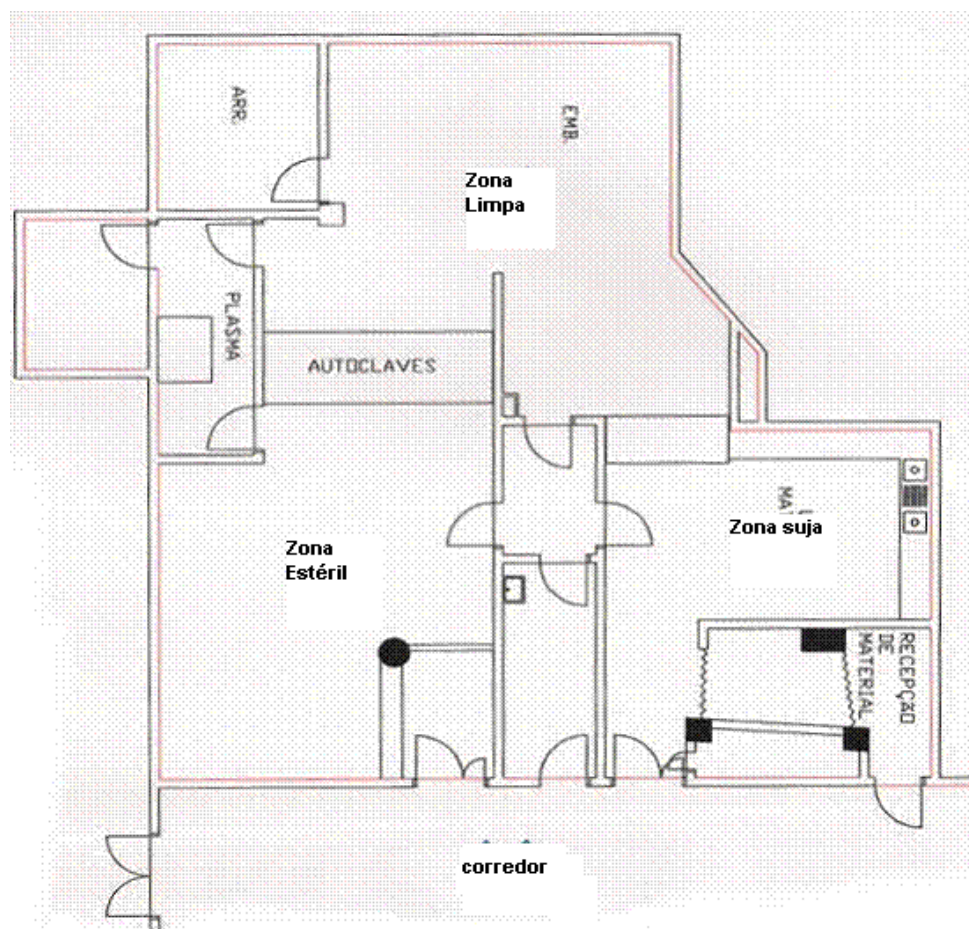
Weinstein R.1998. Nosocomial infection update. *Emerging Infectious Diseases* 4(3):416 - 420.

William AR, PhD, MPH, Weber JD, MD, MPH, and the Healthcare. 2008. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. Infection control practices advisory committee (HICPAC). Department of Health and Human Service-USA.

Wong K, Leung K. 2004. Transmission and prevention of occupational infections in orthopaedic surgeons. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 86A (5):1065-1076.

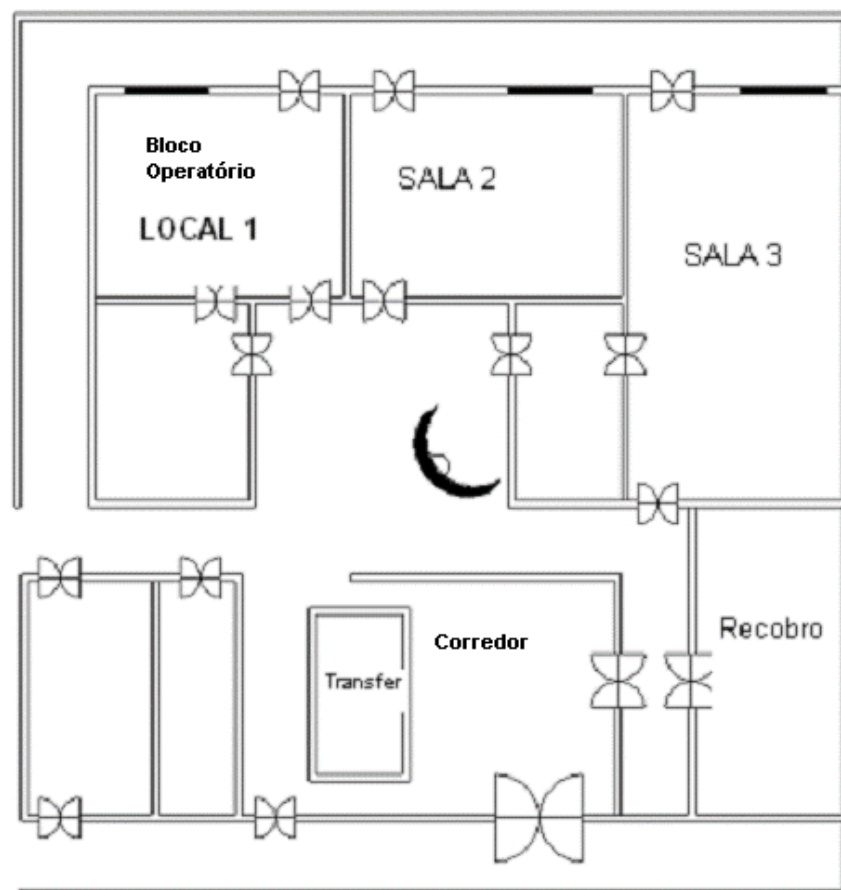
Zhou G, Whong ZW, Ong T, Chen B. 2000 .Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in a indoor environment. *Molecular and Cellular Probes* 14:339-348.

Anexos 1



Esquema representativo do Serviço de Esterilização do Hospital A (Santos 2008).

Anexo 2



Esquema (parcial) representativo do Serviço do Bloco Operatório do Hospital B (Silva 2008).

Anexo 3

Quantidade de fungos na Zona Estéril (SCE) por colheita e identificados no Hospital A

Colheita	Quantidade de fungos/ nº										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C1	64	56,18	30	80	63	21,44	58	74	46,42	32	57
C2	16	17									
C3	43*			19, 20							

Quantidade de fungos no Bloco Operatório por colheita e identificados no Hospital A .

Colheita	Quantidade de fungos / nº				
	1	2	3	4	5
C1	38	51	82	25	
C2	65				
C3	71	66			
C4					
C5	40	35			
C6					
C7	60				
C8	69	62	83	70	11,12
C8					

Quantidade de fungos na Zona Estéril Corredor (SCE) por colheita e identificados no Hospital A.

Colheita	Quantidade de fungos/nº									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C1	23									
C2	1	2,3	24,49	4,5	6,7	29,28	39	8	9, 45	79
C3	53, <u>26</u>	52,22	59,10							

Quantidade de fungos na Zona Limpa (SCE) por colheita e identificados no Hospital A

Colheita	Quantidade de fungos/nº		
	1	2	3
C1	34,50	81,61	67
C2	33		
C3	14,15	72	

Quantidade de fungos na Zona Suja (SCE) por colheita e identificados no Hospital A.

Colheita	Quantidade de fungos/nº								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C1	77,	13,	54	55,47	68	75,31	76	27	73
C3	37								
C2	<u>48, 78</u>	36							

Anexo 4

Quantidade de fungos ao longo do período de amostragem no bloco operatório e o nº dado a cada fungo encontrado no Hospital B. A, B, C são réplicas.

FUNGOS (CFU/m³)			
Bloco Operatório			
Nº colheita	A	B	C
1	3 (1,*)	0	4(6,7,8,41)
2	0	5(12,2,3,4,5)	0
3	0	0	0
4	0	3(9,10,11)	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0

*dois isolados em que não foi obtido DNA.

Anexo 5

Valores de temperatura relativa em °C e humidade relativa em % registados encontrados durante as colheitas no bloco operatório dos dois hospitais (Silva 2008; Santos 2008)

Hospital A			Hospital B	
Bloco Operatório				
Colheita	Temperatura (°C)	Humidade relativa (%)	Temperatura (°C)	Humidade relative (%)
1	20,3	51	19	30
2	20	53	18	51
3	23,5	53	18	30
4	21	54	17	33
5	22	53	18	30
6	20,6	51	20	50
7	20,3	53	19	40
8	20,2	52	18	45

Anexo 6

Valores da Temperatura e Humidade Relativa no SCE do Hospital A (Santos 2008)

Hospital A

	Corredor		Zona Suja		Zona Esterilizada		Zona Limpa	
Colheitas	Temperatura°C	Humidade%	Temperatura°C	Humidade%	Temperatura°C	Humidade%	Temperatura °C	Humidade %
1	23	30	22	30	23	30	26	25
2	24	31	25	30	27	25	27	30
3	23,5	30	23	30	23	30	25	25

